

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas.

Por

MARÍA EUFEMIA MORALES RUBIO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Diciembre 2006

EXTRACTOS DE *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose Y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTINEOPLÁSICA SOBRE LÍNEAS CELULARES HUMANAS.

Comité de Tesis


DRA. MA. JULIA VERDE STAR

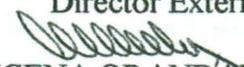
Director de la Tesis


DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO

CoDirector


DRA. DELIA ELVA CRUZ VEGA

Director Externo


DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS

Secretario


DRA. CATALINA RIVAS MORALES

Vocal

Para empezar un proyecto, hace falta valentía.

Para terminarlo, hace falta perseverancia

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de mis asesoras, porque siempre encontré en ellas motivación, apoyo y palabras de aliento, que hicieron a pesar de los tropiezos, pensar positivo y culminar lo iniciado. Gracias por el tiempo dedicado para la asesoría y revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado con la beca número 170397 para la realización de los estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en primera instancia por ser mi Alma Mater, y por su apoyo mediante el Proyecto PAICYT SA-999-04, para la realización de las investigaciones.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por ser la cuna de mi desarrollo profesional y siempre tener abiertas sus puertas para la Investigación.

Al Dr. José Santos García Alvarado, Director de esta facultad durante mi estancia como estudiante de postgrado, gracias por su apoyo.

A la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, por llevar a cabo todos los trámites administrativos para obtener el grado.

A la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, por el invaluable apoyo recibido, sin el cual este trabajo no se podría haber concretado.

Al MC. Noé Rafael Salinas González por haberme proporcionado plantas de *Lophocereus schottii* y al QBP. Hamlet Avilés Arnut y su apreciable familia, que me hicieron llegar los ejemplares de *Stenocereus gummosus*, especies que trabajé en la presente investigación.

Al MC. Biól. Jaime Fco. Treviño Neávez, por su apoyo incondicional y ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Pilar Carranza Rosales por sus consejos y apoyo desinteresado a la realización de este trabajo.

A todos los compañeros de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por su apoyo y colaboración, facilitando en gran manera este trabajo

En especial y con cariño al Grupo de las Seis.

"La grandeza de una nación y su progreso moral pueden ser juzgados por la manera en que sus animales están tratados. Mantengo que cuanto más indefensa está una criatura, más derecho tiene a que el hombre la proteja de la crueldad del hombre."

Mahatma Gandhi

ÁREA DE TRABAJO

La realización del trabajo práctico se llevó a cabo en los laboratorio de: Fitoquímica y Química Analítica del Departamento de Química y el Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Nosotros somos la encarnación local del Cosmos, que ha crecido hasta tener conciencia de sí. Hemos empezado a contemplar nuestros orígenes: sustancia estelar que medita sobre las estrellas; conjuntos organizados de decenas de miles de billones de billones de átomos que consideran la evolución de los átomos y rastrean el largo camino a través del cual llegó a surgir la conciencia, por lo menos aquí. Nosotros hablamos en nombre de la Tierra. Debemos nuestra obligación de sobrevivir no sólo a nosotros sino también a este Cosmos, antiguo y vasto, del cual procedemos.

CARL SAGAN

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
1.1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	5
4. HIPÓTESIS	6
5. OBJETIVO	7
5.1. Objetivo general	7
5.2. Objetivos particulares	7
6. ANTECEDENTES	8
6.1. Cáncer	8
6.1.1. Compuestos antineoplásicos	9
6.2. Bioensayos para determinación de la actividad citotóxica sobre <i>Artemia salina</i> .	13
6.3. Determinación de la actividad antibacteriana	14
6.4. Distribución, descripción y clasificación de las especies estudiadas	14
6.4.1. <i>L. schottii</i> .	14
6.4.1.1. Clasificación botánica	15
6.4.1.2. Descripción	15
6.4.2. <i>S. gummosus</i>	16
6.4.2.1. Clasificación botánica	16
6.4.2.2. Descripción	16
6.4. Antecedentes fitoquímicos de las especies seleccionadas	17
6.6. Análisis fitoquímico	19
6.6.1. Aislamiento de metabolitos secundarios.	19
6.6.2. Extracción con solventes.	19
6.6.3. Identificación química.	20
6.6.3.1. Pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales.	20
6.7. Cultivo de tejidos vegetales y producción de metabolitos secundarios	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS	24
7.1. Reactivos, material y equipo.	24
7.2. Material vegetal	24
7.3. Obtención de extractos	25
7.3.1. Acuoso	25

7.3.2. Metanólico	25
7.4. Material biológico	25
7.4.1. Cultivo de cepas bacterianas	25
7.4.2. Cultivo del crustáceo <i>Artemia salina</i>	26
7.4.3. Cultivo de líneas celulares	27
7.5. Pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales	28
7.5.1. Prueba del KMnO_4	28
7.5.2. Prueba del FeCl_3	28
7.5.3. Prueba de Liebermann-Burchard	29
7.5.4. Prueba de Salkowski	29
7.5.5. Prueba de Molish	29
7.5.6. Prueba del NaOH	29
7.5.7. Prueba de Baljet	30
7.5.8. Prueba de H_2SO_4	30
7.5.9. Prueba de Shinoda.	30
7.5.10. Prueba de Dragendorff	30
7.5.11. Prueba de saponinas	31
7.6. Cultivo "in vitro" de especies vegetales	32
7.6.1. Medio de cultivo	32
7.6.2 Establecimiento del Cultivo "in vitro"	34
7.6.2.1 <i>S. gummosus</i>	34
7.6.2.2. <i>L. schottii</i>	35
8. RESULTADOS	36
8.1. Material vegetal	36
8.2. Obtención de extractos, rendimiento en la extracción de material.	36
8.3. Material biológico	37
8.3.1. Actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas	37
8.3.2. Actividad citotóxica sobre <i>Artemia salina</i> .	38
8.3.3. Actividad citotóxica sobre las líneas celulares:	39
8.3.3.1. Línea celular MCF-7	39
8.3.3.2. Línea celular HeLa	40
8.4. Pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales	42
8.5. Cultivo "in vitro" de especies vegetales	44
8.5.1. <i>S. gummosus</i>	44
8.5.2. <i>L. schottii</i>	46
8.5.3. Pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en tejidos "in vitro"	48
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	52
11. LITERATURA CITADA	53

LISTADO DE TABLAS

Tabla		Página
I	Sales básicas y compuestos orgánicos del medio MS(1962) . . .	32
II	Componentes de las soluciones stock y substock para el medio MS(1962).	33
III	Procedimiento para elaborar 1 L de medio MS(1962) con las soluciones concentradas.	34
IV	Porcentaje de rendimiento obtenido de tallos.	36
V	Efecto del extracto metanólico de <i>L. schottii</i> sobre bacterias de importancia médica. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Listeria monocitogenes</i>	37
VI	Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos acuosos de <i>L. schottii</i> y <i>S. gummosus</i>	42
VII	Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos metanólicos de <i>L. schottii</i> y <i>S. gummosus</i> .	43
VIII	Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos metanólicos de callo de <i>S. gummosus</i> .	48

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta de <i>L. schottii</i> , fotografía tomada de su lugar de origen Baja California Sur, donde se aprecian su característica arborescente con varias ramas, las mas superiores con espinas largas, aplanadas y setosas, flores color rosa pálido.	15
2	a) Arbusto semirecto de <i>S. gummosus</i> tallos semiprostrados. b) Tallo de <i>S. gummosus</i> , con desarrollo floral. c) Fruto completo de <i>S. gummosus</i> y seccionado donde se aprecian pulpa y semillas. .	17
3	Huevecillos de <i>A. salina</i> en agua salada, algunos eclosionando	27
4	Nauplios de <i>A. salina</i> en agua salada.	27
5	Actividad citotóxica de los extractos metanólicos de <i>L. schottii</i> sobre <i>A. salina</i> . LD ₅₀ 64.57 µg/mL. Determinado por el método Probit.	38
6	Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de <i>L. schottii</i> sobre la línea celular MCF-7.	39
7	Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. gummosus</i> sobre la línea MCF-7.	40
8	Gráfica donde se aprecia el efecto citotóxico del extracto acuoso de <i>L. schottii</i> sobre células HeLa, IC ₅₀ 86.44 µg/mL.	41
9	Gráfica donde se aprecia el efecto citotóxico del extracto metanólico de <i>L. schottii</i> sobre células HeLa, IC ₅₀ de 11.44 µg/mL.	41
10	Plántulas de <i>S. gummosus</i> obtenidas por germinación "in vitro" en medio MS (1962).	44
11	Brotos de <i>S. gummosus</i> en proceso de dediferenciación para formar callo, en medio MS (1962).	45
12	Callo de <i>S. gummosus</i> , creciendo en medio MS (1962).	45
13	Callo de <i>S. gummosus</i> para maceración y obtención de extracto. ...	46
14	Areóla lateral de <i>L. schottii</i> en medio MS (1962).	47
15	Callo de <i>L. schottii</i> formado a partir de una areóla lateral en medio MS (1962).	47

NOMENCLATURA

AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Benciladenina
BAP	Bencilaminapurina
CFL	Campana de flujo laminar
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimeltisulfóxido
DE	Desviación Estandar
FeCl ₃	Cloruro férrico
g	Gramo
h	Hora
ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
HeLa	Células de cáncer cervico-uterino
HIV-1	Virus del Sida tipo 1
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria

K	Cinetina
KMnO ₄	Permanganato de potasio
lb	Libra
LD ₅₀	Dosis letal media
Ls	<i>Lophocereus schottii</i>
LsA	Extracto acuoso de <i>Lophocereus schottii</i>
LsM	Extracto metanólico de <i>Lophocereus schottii</i>
MCF-7	Células de adenocarcinoma mamario
MEM	Medio de cultivo para células MCF-7 y HeLa
m	Metro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Murashige & Skoog
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
PBS	Buffer de fosfatos salino
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón

rpm	Revoluciones por minuto
$^{32}\text{P}_i$	Fósforo 32
Sg	<i>Stenocereus gummosus</i>
SgA	Extracto acuoso de <i>Stenocereus gummosus</i>
SgM	Extracto metanólico de <i>Stenocereus gummosus</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen por volumen
°C	Grados centígrados
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

1. RESUMEN

A través de los conocimientos empíricos sabemos que muchas plantas están dotadas de propiedades curativas, este conocimiento se aprovecha para buscar productos con potencial terapéutico. Son estas sustancias activas, las que luego se intenta transformar en drogas útiles sometiéndolas a modificaciones químicas. El objetivo de este trabajo fue probar la actividad biológica de los extractos crudos de *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus*, para lo primero se obtuvieron extractos con diversos solventes, a los que se les realizaron las pruebas químicas para determinación de grupos funcionales. Los extractos fueron probados sobre bacterias de interés médico: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*, sobre *Artemia salina*, y sobre las líneas celulares de cáncer MCF-7 y HeLa. Los resultados de las pruebas químicas para determinar grupos funcionales nos indican que ambas especies presentan alcaloides tanto en los extractos acuosos como en los metanólicos. De las dos especies investigadas, el extracto metanólico de *Lophocereus schottii* muestra acción bactericida sobre todas las cepas, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa*, así como acción citotóxica sobre *Artemia salina* con una LD₅₀ de 64.57 µg/mL. Los extractos acuoso y metanólico de *Lophocereus schottii* presentaron una IC₅₀ sobre la línea celular HeLa de 86.44 µg/mL y 11.44 µg/mL respectivamente. Para la línea celular MCF-7 la citotoxicidad no fue relevante. El resultado observado en el extracto metanólico de *Lophocereus schottii* sobre la línea celular HeLa, es muy prometedor para la búsqueda de antineoplásicos. El cultivo "in vitro" se logró con el medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con Bencilaminopurina 2 mg/L y Kinetina 1 mg/L. Es muy recomendable dar seguimiento al cultivo "in vitro" de estas especies, para optimizar la obtención de metabolitos de interés biológico.

1.1 ABSTRACT

We know through empirical knowledge that many plants have medical properties, this knowledge are used to search products with therapeutic potential. Later these active substances are transformed into useful drugs through chemical modifications. The objective of this work was to prove the crude extracts biological activity of *Lophocereus schottii* and *Stenocereus gummosus*, first we use solvents to obtained extracts which were chemical tested to determine functional groups on them. The extracts were proven on medical interest bacteria like: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*; *Artemia* saline, and on cellular lines of cancer MCF-7 and HeLa. The results chemical test to determine functional groups indicated that both species presented alkaloids in the methanol and aqueous extracts. Of two investigated species, the methanol extract of *Lophocereus schottii* shows bactericidal action on all species, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*, as well as cytotoxic action on *Artemia saline* with LD₅₀ 64.57 µg/mL. The aqueous and methanol extracts of *Lophocereus schottii* presented an IC₅₀ 86.44 µg/mL and IC₅₀ 11,44 µg/mL on the cellular line HeLa. On the cellular line MCF-7 the cytotoxic action was not important. The result observed in the methanol extract of *Lophocereus schottii* on the cellular line HeLa, it is very promising for the search of anti neoplastic compounds. The culture "in vitro" for both species, was obtained with Murashige and Skoog (1962) culture, added with Benzylaminopurine 2 mg/L and Kinetin 1 mg/L. It is advisable to follow the culture "in vitro" of these species, to optimize the metabolites production of biological interest.

2. INTRODUCCIÓN

A través de su historia, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción de sus necesidades básicas, comida, calzado, vestido, medios de transporte, sabores y olores, no menos importante, es el uso que desde tiempos remotos el hombre hizo de las fuentes naturales para curar sus afecciones (Cragg and Nexman, 1999a; Paolini, 1998).

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años. Estos sistemas continúan desarrollando actualmente un papel esencial en la salud, (Paolini, 1998). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente, el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud. (Cragg and, Nexman, 1999a).

Un análisis de las prescripciones presentadas en farmacias de Estados Unidos arrojó en 1998 que alrededor del 25 % contienen extractos de plantas o principios activos derivados de ellas; por otra parte, no menos de 119 sustancias químicas, derivadas de 90 especies pueden ser consideradas de importancia actualmente en muchos países, de ellas, el 74 % fue descubierto como resultado de estudios químicos o aislamiento de los principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional (Cragg and Nexman, 1999a).

La quimioterapia ortodoxa usada en el tratamiento del cáncer se basa en el uso de drogas que inhiben el desarrollo incontrolado de células anormales. Muchos de los productos químicos usados se basan en agentes como la mostaza nitrogenada, descubierta durante la II Guerra Mundial (Popoca *et al.*, 1996), cuando se usó de manera terapéutica, controlada y dirigida hacia cierto fin. Desde una perspectiva farmacológica, el fármaco "ideal" mataría las células de cáncer sin dañar células normales, en esto se trabaja, sin embargo, la búsqueda de principios activos aislados de fuentes naturales como potenciales agentes quimioterapéuticos se mantiene (Cragg and Nexman, 1999b; Paolini, 1998). Un informe presentado por la Annual Reports of Medicinal Chemistry en 1995 indica que alrededor del 60 % de los fármacos aprobados para el cáncer y como agentes antiinfecciosos son de origen natural (Rodríguez y Laza 2001).

Las plantas tienen una larga historia en el tratamiento del cáncer, (Cragg and Nexman, 1999a,b; Popoca *et al.*, 1996), aunque muchas veces han sido observadas con cierto escepticismo por las características propias de la enfermedad, (Cragg and Nexman, 1999a,b; Paolini, 1998). sin embargo actualmente, muchas personas que padecen de cáncer desean someterse a terapias conocidas como alternativas (Dowdy, 2002) con productos principalmente de uso tradicional, ejemplo de ello son la acupuntura, el Reishi

(*Ganoderma lucidum*), la homeopatía, así como las dietas, entre otras, muy utilizadas en la medicina oriental y de la cual existen informes en la literatura que avalan sus usos clínicos.

La homeopatía, por solo citar un ejemplo se encuentra entre los métodos terapéuticos que al parecer controlan las defensas del organismo. Un estudio presentado en la revista *European Journal of Pharmacology* demostró que el producto homeopático *Silicea* estimula a los macrófagos que son parte del sistema inmune (Rodríguez y Laza, 2001).

Finalmente se puede plantear que las plantas medicinales son una fuente de obtención de principios activos de marcada importancia en las investigaciones actuales. La naturaleza es una abundante fuente de fármacos, sin embargo, se estima que solo del 5 al 15 % de las aproximadamente 250,000 especies han sido estudiadas sistemáticamente por la presencia de compuestos bioactivos. La comunidad científica internacional ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes de principios activos a partir de plantas conocidas como potenciales anticancerígenos. La nueva era de los anticancerígenos ha estado encabezada por productos como el taxol, docetaxol, entre otros (Laza *et al.*, 2003).

En la actualidad la utilización de líneas celulares cancerosas y los avances en la automatización de las pruebas farmacológicas, así como nuevas técnicas para identificar sustancias activas, permiten un avance continuo en este campo. En todos los casos, lo que se busca es información sobre sustancias activas, las que luego se intenta transformar en drogas útiles sometiéndolas a modificaciones químicas (Paladini, 1996; Fabricant and Farnsworth, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

A pesar de que se han aislado y reportado algunos de los metabolitos producidos a partir de muchas plantas medicinales, entre ellas *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus*, y de que existen evidencias de su utilización en medicina tradicional mexicana en la cura del cáncer, no se tienen estudios farmacológicos que puedan confirmar su valor terapéutico y solo hay dos reportes sobre líneas murinas que avalan su actividad antineoplásica. Con éste trabajo nos proponemos caracterizar el efecto antineoplásico de los extractos obtenidos de *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus*, así como el establecimiento de los cultivos vegetales "in vitro" para la obtención de los metabolitos secundarios responsables de esta actividad.

4. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos y metanólicos de *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus* presentan actividad antibacteriana y antineoplásica.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana y antineoplásica de extractos acuosos y metanólicos de *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus*.

5.2 Objetivos Particulares

- ✿ Obtención de extractos acuosos y metanólicos en las especies seleccionadas.
- ✿ Determinar en forma parcial los compuestos presentes en los extractos a través de pruebas químicas para determinación de grupos funcionales.
- ✿ Evaluar y determinar la actividad biológica de los extractos:
 - ⊕ Actividad antibacteriana sobre bacterias de importancia médica: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*.
 - ⊕ Actividad citotóxica sobre *Artemia salina*.
 - ⊕ Actividad citotóxica sobre las siguientes líneas celulares: MCF-7 de adenocarcinoma, glándula mamaria (ATCC HTB-22) y HeLa de cáncer cérvico uterino (ATCC CCL-2).
- ✿ Establecer el cultivo "in vitro" de ambas especies vegetales en base a los resultados de la actividad citotóxica.

6. ANTECEDENTES

Desde de los albores mismos de la civilización, las plantas han proporcionado medicinas a la humanidad. A lo largo de la historia, diversas culturas han legado a las generaciones posteriores los conocimientos acumulados sobre las plantas medicinales. Esta amplia información sirve ahora de base a gran parte de la medicina tradicional. Las plantas siempre han sido parte integral de la práctica de la medicina (Morón, 2002).

La palabra droga proviene de *drogge*, del antiguo idioma holandés y quiere decir “secar”, ya que los antiguos farmacéuticos, médicos y curanderos con frecuencia dejaban secar las plantas para usarlas como fármacos. Hoy en día, aproximadamente el 25 % de las medicinas que se recetan siguen siendo derivadas de las plantas (Fresle and Wolfheim, 1997).

Durante los últimos 20 años ha crecido en gran medida el interés acerca de las plantas medicinales en la sociedad occidental. Aunque a partir del siglo pasado, el empuje de la industria farmacéutica hizo que la curación fundamentada en el empleo de plantas fuese vista como una práctica primitiva e irracional, en décadas recientes tales ideas han experimentado un extraordinario resurgimiento. En la actualidad se realizan descubrimientos científicos que están confirmando el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y su uso se está transformando en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados, de hecho, constituyen una fuente alternativa de tratamiento (García *et al.*, 2005).

Las poblaciones indígenas del país conocen las propiedades curativas de muchas especies, usándolas de forma permanente, sin embargo la comprobación científica de su valor medicinal no se ha llevado a cabo (Lozoya, 1976).

6.1 Cáncer

El denominador común en el cáncer es el daño al material genético de la célula, lo cual conduce a una proliferación celular sin control. La mayoría de los agentes cancerígenos inducen mutaciones en el DNA (Kumate *et al.*, 1990).

El cáncer no es una sola enfermedad sino un grupo de más de 200 enfermedades distintas en las que se produce un crecimiento anormal de las células, hasta convertirse en masas de tejidos llamados tumores. Hay dos tipos de tumores: benignos o no cancerosos y malignos o cancerosos. Los tumores benignos tienen seis características principales: Sólo crecen hasta un determinado tamaño, normalmente no crecen muy rápido, no destruyen células normales, no se propagan al tejido que les rodea, normalmente no producen efectos secundarios graves y por lo general crecen de una manera ordenada. Los tumores malignos se conocen por su capacidad para invadir y destruir tejidos y órganos, tanto los que están cerca como los que están lejos del tumor original (Hoffman, 1999).

El cáncer puede ser causado por factores endógenos y exógenos. Dentro de los primeros están causas genéticas principalmente; y entre los segundos: la exposición a determinados factores como: radiación (UV, X, Gamma), venenos, fármacos, pesticidas, virus (retrovirus, herpes, papilovirus), metabolismo de microorganismos, priones, viroides (Hoffman, 1999).

6.1.1 Compuestos Antineoplásicos

La quimioterapia en enfermedades neoplásicas ha tenido grandes avances. En la presente década ha sido descubierta una nueva familia de compuestos, las diarilsulfonilureas (Howert and Grossma, 1990; Howert, 1991) no emparentada con los oncolíticos conocidos y que presentan un amplio espectro de actividad contra tumores sólidos.

En la actualidad, las plantas constituyen la principal fuente de obtención de la mayoría de los fármacos que pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer (Pérez *et al.*, 2005).

Uno de los casos más importante a nivel biológico y sintético, es el de los alcaloides aislados de la corteza de la quina, que proviene de la familia *Rubicaceas* del género *Cinchona* (Meléndez-Gómez and Kouznetsov 2005). El análisis detallado del extracto de quina permitió a los químicos identificar más de 20 alcaloides, de los cuales la quinina (1), la cinconidina (2), la quinidina (3) y la cinconina (4) son las sustancias de mayor actividad biológica (Kouznetsov and Palma, 1997).

A diferencia de los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos convencionales, el sulofenur (primera diarilsulfonilurea en fase clínica) en estudios clínicos en fase II no induce alopecia, ni es mielosupresivo, ni cardiotoxico, ni nefrotóxico. Como efectos secundarios de esta familia cabe destacar la metahemoglobinemia, producida por uno de los metabolitos y la hipoglucemia que suele venir asociada a un buen número de sulfonilureas (Boder *et al.*, 1992).

Los estudios realizados y publicados hasta el momento sobre el sulofenur, han demostrado que es muy activo en cepas de linfosarcoma (6C3HED) y mielomas de células plasmáticas (X5563), adenocarcinomas (CA755 y C3H), carcinoma de ovario (M-5), de colon (26), e inactivo en carcinoma de pulmón Lewis, melanoma (B16) y leucemia linfocítica (P388). (Gil *et al.*, 1999).

Hoffman, (1999), hace hincapié en que los metabolitos primarios son aquellos que dan o ceden energía en las reacciones bioquímicas, el producto de todos los otros tipos de reacciones es llamado metabolito secundario, son precisamente estos los que tienen múltiples usos, entre ellos son empleados como agentes antineoplásicos, pero la dosificación es muy importante ya que por arriba de cierto umbral serán tóxicos e inclusive cancerígenos para el paciente. Uno de los problemas principales para inhibir el cáncer es no afectar el metabolismo de las células normales. Se menciona que la mayoría de las sustancias utilizadas contra el cáncer actúan como inhibidores enzimáticos de la glicólisis anaerobia y muchas de estas sustancias provienen de plantas. Según Hoffman: una droga anticancerígena ideal sería aquella que no solamente distingue entre célula normal (para no afectarla) y cancerosa (para eliminarla) sino que también elimina permanentemente todas las subpoblaciones del tumor (metástasis).

Osorio *et al.*, (2000), hacen mención que la Peroxisomicina A1 (PA1) es un potencial fármaco antineoplásico que se encuentra en fase I de investigación clínica.

Chávez *et al.*, (2001), trabajaron con extractos de CHCl_3 de tallos de *Erithroxylum rotundifolium*, aislando seis tropano-alcaloides, todos con actividad citotóxica contra líneas celulares humanas.

Se ha reportado la presencia de sustancias con actividad potencial quimiopreventiva para el cáncer en *Physalis philadelphica*, del fruto se reportan 3 withanólidos (esteroides), los cuales inducen la fase II de la enzima quinona reductasa, también reportan otros compuestos con esta actividad en hojas y tallos de esa planta (Bao-Ning *et al.*, 2001).

Valles *et al.*, (2001), purificaron una peroxisomicina (PA4), de *Karwinskia spp.* Se cree que este compuesto al igual que otras obtenidas de esta planta (las peroxisomicinas A1, A2 y A3), presentará efectos antineoplásicos, como los que presenta la A1, la cual se halla en fase clínica 1.

De las raíces de *Codonopsis lanceolata* se aisló una saponina denominada ester xilopiranosil codonopsida, observándose durante los bioensayos una fuerte actividad citotóxica en concentraciones de 11.8 $\mu\text{g/mL}$, contra células 3LL (Hee-Juhn *et al.*, 2001).

Muriel *et al.*, (2001), probaron el brusatol un cuasinoide aislado del fruto de *Brucea javanica* el cual se sabía era un estimulador de la diferenciación celular en varias líneas de células de leucemia en concentraciones de 5-25 $\mu\text{g/mL}$.

López *et al.*, (2001), probaron extractos metanólicos y de diclorometano de *Lithraea molleoides*, sobre líneas celulares de tumores: la Hep 22 (línea celular de carcinoma hepatocelular) y la SK-MEL-28 (línea celular de melanoma maligno.) siendo positiva la actividad citotóxica para ambas.

Shiuan *et al.*, (1998), reportan en sus ensayos con ratones (línea celular MCF-7aro) una disminución considerable de un 70% de los tumores mamarios, en aquellos ratones que se les proporcionó 0.5 mL de jugo de uva diario por 5 semanas, vía sonda (gavage feeding).

Silva, (2005), probó un extracto etanólico de *Schinus molle* sobre la línea celular CHANG y OK, observando un incremento de la viabilidad conforme se elevaba la concentración del extracto.

Las fracciones polares de los extractos de diclorometano de *Rollinia sylvatica* presentan acción citotóxica sobre líneas celulares de tumor RAW 264.7 y no causan ningún efecto en las células endoteliales normales, que también fueron tratadas (Pires *et al.*, 2001).

Bianchi and Cole, 1969, reportan la presencia de n-butanol en un extracto acuoso de *Agave schottii* y el cual inhibe significativamente el carcinosarcoma Walker 256 en concentraciones de 75 y 3.7 mg/kg. El material activo fue identificado como saponina. De las seis saponinas separadas la número 4 mostró casi la misma actividad antitumoral que el compuesto activo, de 65 a 33 mg/kg. La gitogenina fue la genina identificada de las 4 saponinas activas presentes. El azúcar presente en la saponina más activa fue la galactosa, las otras tres saponinas contienen galactosa y glucosa.

La camptotecina y sus derivados, alcaloides del árbol chino *Camptoteca acuminata*, muestran un amplio espectro de actividad citotóxica. La camptotecina es un fármaco que actúa sobre la división celular e inducir la muerte de la célula por apoptosis (Meza, 2005)

El taxol un compuesto obtenido de extractos de *Taxus brevifolia*, y aislado en 1971, exhibía una marcada acción antitumoral en contra de una amplia gama de tumores en roedores, este producto conocido con el nombre genérico de Paclitaxel, tiene la ventaja de tener actividad antineoplásica y mínimos efectos secundarios en el paciente. Su acción a nivel molecular es sobre la tubulina (la cual al ensamblarse forma los microtúbulos, constituyentes del huso mitótico durante la división celular), suprimiendo el desensamble de los microtúbulos del huso e induciendo apoptosis celular. <http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol1.htm>

Kinoshita *et al.*, (1999), probaron 17 triterpenos derivados de cactáceas para ver el efecto antineoplásico "in vitro", usando el ^{32}P como vehículo para incorporarlo dentro de los fosfolípidos de las células HeLa. De los productos probados el ácido betulínico, fue el que mostró mayor actividad antineoplásica, este compuesto se caracteriza porque en el carbón 28 presenta un grupo carboxilo, y esto parece ser determinante para la acción inhibitoria. Otro compuesto el eritrodiool, aunque menos efectivo, también

presenta actividad antitumoral, y se caracteriza porque en el carbón 28 tiene un grupo hidroximetilo.

Wall *et al.*, (1976), hacen una revisión de los métodos de extracción y caracterización de agentes antitumorales de plantas. Mencionan entre otros métodos, la extracción con solventes, varios tipos de cromatografía para la purificación como: capa fina, gel, líquida y para la determinación de los compuestos mencionan: espectroscopía ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, rayos X y cristalografía.

Wall *et al.*, (1994), encontraron tres nuevos biflavonoides, llamados genéricamente calicópteros, los cuales tienen efecto citotóxico sobre una amplia gama de líneas celulares de tumores sólidos. Estos compuestos fueron aislados de flores de *Calycópterus floribunda* (Combretaceae).

Karkabounas *et al.*, (2000), trabajaron con extractos liofilizados de *Abies alba* y *Viscum album*, para probar sus propiedades anticancerígenas en ratas previamente tratadas con benzo-alfa-pireno un inductor de tumores y sobre cultivo de células malignas L1210. Obteniendo como resultados: un efecto antiproliferativo de células malignas L1210, así como una reducción de los tumores y un aumento en la expectativa de vida de las ratas tratadas; concluyen que los efectos antiproliferativos, pueden ser debido a las lectinas y tioninas de *V. album* y a los monoterpenos de *A. alba*.

Franco *et al.*, (2001), reportan el uso del extracto metanólico de *Lophophora williamsii*, sobre macrófagos murinos y además sobre el crecimiento y viabilidad de diversas células tumorales y normales humanas. Teniendo como resultados que la aplicación del extracto, estimuló la producción de óxido nítrico por los macrófagos y activó la proliferación de linfocitos de timo y bazo. También se tuvo una inhibición significativa del crecimiento tumoral de líneas de diferente estirpe celular.

Pessoa *et al.*, (2001), demostraron la actividad citotóxica de la oncocalyxona A (onco A) derivada de *Auxemma oncocalyx* y demostraron su actividad apoptósica sobre células de leucemia HL-60.

Murillo *et al.*, (2001), reportó el uso de 25 extractos etanólicos de plantas medicinales de Baja California Sur sobre la línea celular HCT-116 y microorganismos de importancia médica, obteniendo citotoxicidad e inhibición de crecimiento en concentraciones de 100 µg/mL.

Solís *et al.*, (2001), trabajaron con alcaloides que presentan indol, la indolquinolizina y el cloruro de indolquinolizina, los probaron sobre líneas celulares de origen linfoide y mielóide. Observándose una inhibición en la línea tumoral humana H9 (linfoma).

Manners *et al.*, (2000), reportan que los cítricos presentan una gama de compuestos entre los que sobresalen los limonoides (glicósidos y agliconas), que en líneas celulares han demostrado que presentan una fuerte capacidad antitumoral contra cánceres de pulmón, bucal, seno y de colón.

6.2 Bioensayos para Determinación de la Actividad Citotóxica en *Artemia salina*.

En 1957 el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los E.U.A., inició la búsqueda de productos de las plantas con actividad antitumoral. Más de 120,000 extractos de 35,000 especies de plantas han sido probadas. Los métodos que se han utilizado para probar la actividad de los productos naturales han variado a través del tiempo, siendo los primeros las pruebas "in vivo" 3PS (Leucemia de ratón inducida por metil-colantreno) y la prueba de citotoxicidad "in vitro" 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano). La prueba 3PS "in vivo" fue con el tiempo remplazada por la prueba "in vitro" de las líneas celulares, pero esta tiene la gran desventaja de su alto costo para detectar los agentes antitumorales. Se desarrolló un bioensayo para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos conocido como "letalidad de larvas de *Artemia salina*" (la artemia es un pequeño crustáceo, cuya principal ventaja es que se desarrolla y cría fácilmente), que consiste en la determinación de la DL_{50} de los extractos de las plantas, aquellos que presentan una $DL_{50} < 1000$ ppm, es muy probable que contengan uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para repetir bioensayos a concentraciones menores. El bioensayo con *Artemia salina* es sugerido como una prueba conveniente para actividades farmacológicas en extractos de plantas, que puede ser manifestado como toxicidad hacia las larvas; no es específico para actividad antitumoral ni ninguna otra acción fisiológica particular, pero es posible usarlo para monitorear el fraccionamiento más que otros bioensayos citotóxicos que consumen más tiempo y costo. Este bioensayo es una prueba preliminar, la cual detecta un amplio rango de compuestos activos (antitumoral, antibiótico, etc.) además de ser un método simple, rápido, de bajo costo, reproducible y es utilizado como un método selectivo para conocer la citotoxicidad de los extractos de las plantas antes de pasar a las pruebas con las líneas celulares (McLaughlin, 1988).

Abreu *et al.*, (2001) demostraron que la actividad biológica del extracto hidroalcohólico de *Bromelia pinguin* frente a *A. salina* es baja ya que su $LD_{50} > 1,000$ $\mu\text{g/mL}$.

Ramos *et al.*, (2005), reportan la actividad citotóxica de extractos acetónicos y hexánicos de *Agave lechuguilla* y hexánicos de *Acacia berlandieri*, *Acacia gregii* y *Brassica nigra* contra *Artemia salina* con una LD_{50} de 53.5, 56.3, 86.3, 120 y 131.6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

6.3 Determinación de Actividad Bactericida

Una gran cantidad de los metabolitos producidos por las plantas presentan efectos antimicrobianos (Cateni *et al.*, 2003).

Irobi *et al.*, (1994), realizaron estudios sobre las características fitoquímicas y propiedades antimicrobianas de *Bridelia ferruginea*, confirmando la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. lactis* y *Klebsiella sp.*

Los extractos hexánicos de hoja de *Carlowrightia cordifolia*, reportan actividad antimicrobiana, sobre diferentes especies de interés médico (Cruz-Vega, 2002).

En los trabajos realizados por Aiyelaagbe *et al.*, (2000), con extractos de raíz de *Jatropha podagrica*, mostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, comparable con la gentamicina.

Silva, (2005), probó varios extractos de plantas para la determinación de la actividad antimicrobiana, usando el método de difusión de placa con discos de papel filtro.

6.4 Distribución, Descripción y Clasificación de las Especies Estudiadas

6.4.1 *L. schottii*.

En cuanto a su distribución, según Bravo y Sánchez, (1978), es en el desierto Crasicaule que comprende el norte del estado de Sonora hasta Arizona; es una área donde abundan las cactáceas, de ahí el nombre de crasicaule, también se halla distribuida en el sur del desierto sarcófilo (donde abundan plantas con hojas carnosas) que comprende el tercio medio de la Península de Baja California y en el desierto arbocrasicaulescente que comprende el tercio inferior de la Península de Baja California y en menor grado en los valles de la selva baja caducifolia espinosa. Bravo y Sánchez, (1978) describen y clasifican esta especie en la forma siguiente:

6.4.1.1 Clasificación Botánica.

Orden cactales, Familia Cactaceae, Subfamilia Cereoidea, Tribu Pachycereae, Subtribu Stenocereinae, Genero *Lophocereus*, Especie *L. schottii* (Engelmann) Britton and Rose.

6.4.1.2 Descripción.

Lophocereus (Berger) Britton et Rose. Contr. U.S. Nat. Herb. 12:426. 1909. *Cereus* Miller, Gard. Dict ed. 8 1768 pp. *Pilocereus Lemaniere*, Ilustr. Hort. 9: Misc. 97. 1862. p.p. *Cereus* Mill. Subg. *Lophocereus* Berger, Rep. Mo. Bot. Gard. 16: 22. 1905. *Lophocereus* (Berger) Britton et Rose, Contr. U.S. Nat. Herb. 12:426. 1909, *Cereus* Miller, Gard. Dict. ed 8. 1768, p.p. *Pilocereus Lemaire*, Ilustr. Hort. 9: Misc. 97. 1862. p.p. *Cereus* Mill. Subg. *Lophocereus* Berger, Rep. Mo. Bot. Gard. 16 : 22. 1905. *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton et Rose.

Plantas arborescentes o en forma de matorrales con pocas o numerosas ramas que salen desde la base (en la var. *australis* de un tronco corto y en parte media de otras ramas). Costillas de las ramas jóvenes 4 a 10, en las ramas maduras 5 a 13 Aréolas inferiores pequeñas, ovales, ligeramente lanosas, de 3 a 5 mm de ancho; espinas 1 a 15, de 2 a 10 mm de largo, grises o morenas. Aréolas superiores circulares o elípticas, más anchas que largas, de 7 a 15 mm de ancho, densamente lanosas; espinas 20 a 75, de 3 a 7 y hasta 11 cm de largo, ligeramente aplanadas, torcidas, setosas, en fascículos compactos. Flores infundibuliformes, hasta como de 4 cm de largo y 3 cm de ancho, blanquecinas o con tinte rosa. Fruto rojo, carnoso, globos hasta ovalado u oblongo, de 1 a 3 cm de ancho, con pulpa roja. Semillas pardas, casi negras, brillantes, ovaladas, de 2 a 3 mm de largo y 1.5 a 2 mm de ancho, hilo casi basal. Figura 1.

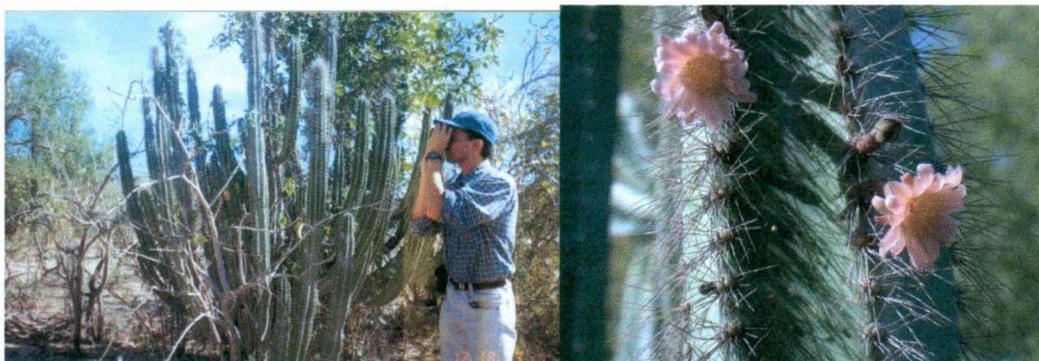


Figura 1. Planta de *L. schottii*, fotografía tomada de su lugar de origen Baja California Sur, donde se aprecian su característica arborescente con varias ramas, las mas superiores con espinas largas, aplanadas y setosas, flores color rosa pálido.

6.4.2 *S. gummosus*

Planta dominante en muchas zonas desérticas que tiene una distribución muy amplia en la Península de Baja California e islas adyacentes del Golfo de California, como: Isla Tiburón, Isla Tortuga e Isla Ángel de la Guarda. Se encuentra desde el norte de Ensenada, aparece en la región de Vizcaíno, Magdalena, Santa Rosalía, Bahía Concepción, San Ignacio, hasta un poco al norte de Todos Santos y La Paz. Ningún otro cacto ocupa una extensión mayor en la península. También se desarrolla en las franjas angostas de los litorales de Sonora desde El Desemboque hasta Cerro Prieto y norte de Sinaloa (Mercado y Granados, 1999; Bravo y Sánchez, 1978; Anderson *et al.*, 2001; León y Pérez-Navarro, 1997).

Bravo y Sánchez, (1978) describen y clasifican esta especie en la forma siguiente:

6.4.2.1 Clasificación Botánica.

Orden: Cactales (Caryophyllales), Familia: Cactaceae, Subfamilia: Cactoideae, Tribu: Pachycereae, Subtribu: Stenocereinae, Género: *Stenocereus* (Engelmann), Especie: *S. gummosus*. (Gibson y Horak).

6.4.2.2 Descripción.

Nombre vulgar: Pitaya agria o Pitayo agrio.

Sinónimos: *Cereus gummosus*, *C. cumengei*, *C. flexuosus*, *Lemaireocereus cumengei*, *L. gummosus*, *Machaerocereus gummosus* (Engelmann) Britton et Rose. (Bravo y Sánchez, 1978) *Rathbunia gummosa* (Brandege) Heat. (Anderson *et al.*, 2001; Pimienta, 1999).

Stenocereus gummosus (Engelm) Gibson y Horak, es un arbusto semi-erecto que forma matorrales como de 10 m o más de diámetro, de 1 a 3 m de alto, con ramificación abierta desde abajo, los tallos se inclinan generalmente del mismo lado o son semiprostrados (Martínez 1994). Ramas de 5 a 8 cm de diámetro bajas, obtusas, color verde oscuro. Costillas 8, rara vez 7. Aréolas más bien grandes, distantes entre sí como por 2 cm. Espinas gruesas; radiales 8 a 12, redondeadas o algo aplanadas, como de 8 a

15 mm de largo, espinas centrales 3 a 9, gruesas y fuertemente aplanadas, todas de color gris, con la punta ligeramente más oscura. Una de las espinas centrales es más larga que las otras (4 cm de largo). Todas las especies que fueron estudiadas por Gibson y Horak; presentan cristales (cuerpos de silicatos) en la piel y la corteza del tallo altamente mucilaginoso). Flores, una en cada aréola, de color blanco fragantes y nocturnas con apertura en una única noche, principalmente entre julio y septiembre, de 10 a 15 cm de largo; Su fruto es ovoide hasta globoso, de 6 a 8 cm de diámetro, color rojo brillante, espinoso, las aréolas caen cuando el fruto madura, pulpa jugosa, de color rojo intenso, de sabor agradable y algo agrídulce. Las semillas negras, oblicuamente reniformes, con hilio lateral hundido en la parte más angosta Figura 2 (Mercado y Granados, 1999; Bravo y Sánchez, 1978; Pizzetti, 1985; Molina et al., 1998; Vázquez *et al.*, 1993).

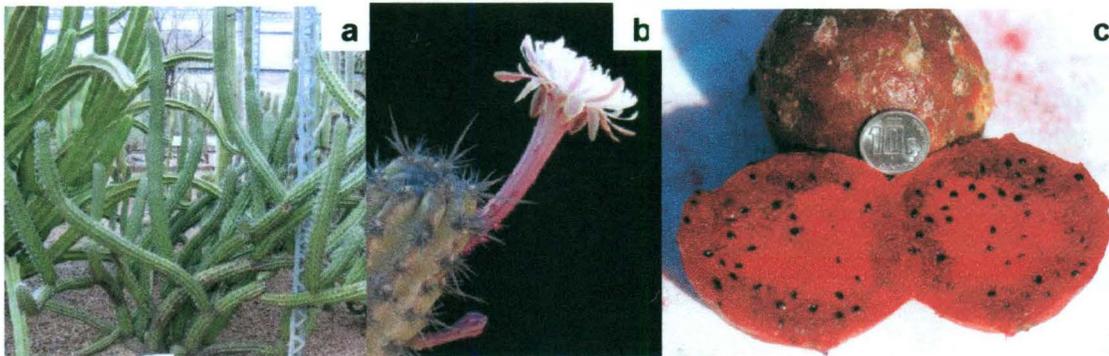


Figura 2. a) Arbusto semirecto de *S. gummosus* tallos semipostrados. b) Tallo de *S. gummosus*, con desarrollo floral. c) Fruto completo de *S. gummosus* y seccionado donde se aprecian pulpa y semillas.

6.5 Antecedentes de las Especies Seleccionadas

Bravo y Sánchez, (1978), reportan los siguientes compuestos químicos para *L. schottii*, triterpenos: lupeol y lofenol; parece ser un intermediario del paso de lanosterol a colesterol-estigmasterol. También reportan que el cocimiento del tallo es utilizado con mucha frecuencia en medicina popular para curar diabetes y cáncer, siempre prefiriendo los tallos de cinco costillas.

Wani *et al.*, (1980), al realizar estudios en extractos a partir de *L. schottii* sobre inhibición de tumores, aislaron dos compuestos: pilocereína, al que describen como un alcaloide trimérico (C-O-C), derivado del alcaloide monomérico lofocereína y de lofocina, alcaloide dimérico reportado con actividad citotóxica.

La presencia de alcaloides en *L. schottii* esta influenciado por la edad de la planta (condición fisiológica), más no por su ubicación geográfica. También se menciona que esta especie presenta dos alcaloides, lofocereína y pilocereína (Bravo y Sánchez, 1978).

Bravo y Scheinvar, (1995), reportan que *L. schottii* contiene el alcaloide pilocereína y el triterpeno lupeol. Esta planta está reportada en la medicina tradicional como un medicamento efectivo para combatir algunos tipos de cáncer, úlceras, diabetes y reumas. Se recomienda tomar los tallos en infusión (100 g de tallo por 2 L de agua, se hierva y se deja consumir el agua hasta tener un litro de cocimiento, se cuele y se pone al refrigerador para tomarla durante el día como agua de uso, durante el tiempo que sea necesario).

L. schottii florece de abril a agosto, la fructificación ocurre de julio a octubre. Las frutas se comen frescas, en jarabe o conserva. El grupo étnico de los Cochimí de Baja California central valora esta planta más por sus tallos, ya que los utilizan como un veneno para los peces. <http://desertplants.clawz.com/index.htm>.

En el Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, (1994), se reporta que *L. schottii* produce los alcaloides: isoquinolina, lofocerina (en toda la planta) y pilocereína (solo en tallos); los triterpenos lofenol y lupeol y el esterol escotenol en tallos. El extracto etanólico de la planta presentó actividad citotóxica sobre células de carcinoma humano 9KB y antitumoral en ratón con leucemia P388 administrada por vía intraperitoneal. En Sonora usan los tallos de esta planta para curar heridas, úlceras, cáncer estomacal y diabetes.

Rico-Bobadilla *et al.*, (2001), trabajaron con la planta Músaro; usando extractos liofilizados contra 5 cepas de las cuales las que mostraron inhibición fueron *Escherichia coli* y *Salmonella thypi*.

Fimbres y García, (1998), trabajaron con una mezcla de extractos de *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Lophocereus schottii* reportando actividad bactericida y fungicida.

Bravo y Sánchez, (1978); Anderson *et al.*, (2001); Bravo y Scheinvar, (1995), reportan que *Stenocereus gummosus* presenta triterpenos y saponinas, compuestos venenosos para algunas especies, por lo que pedazos del tallo son tirados al agua para envenenar peces y posteriormente consumirlos. Los triterpenos encontrados en esta especie son: ácido machaérico, ácido machaerínico (isómero del ácido queretaroico de *Stenocereus queretaroensis* y del ácido cochálico de *Myrtillocactus cochal*) y la gummosogenina.

Avilés, (2000), reporta que el extracto metanólico de la cáscara del fruto de *S. gummosus* presenta oxhidrilos fenólicos y saponinas. Los extractos metanólicos de la cáscara y la pulpa poseen carbohidratos. Mientras que el extracto clorofórmico de la cáscara dio positivo a los alcaloides.

6.6 Análisis Fitoquímico

6.6.1 Aislamiento de Metabolitos Secundarios.

Los metabolitos secundarios, son pequeñas moléculas producidas por un organismo pero que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del mismo. El concepto de metabolitos secundarios incluyen moléculas o productos biológicos derivados del metabolismo primario como un resultado de la limitación de nutrientes, mecanismos de defensa, moléculas reguladoras. El aislamiento de los metabolitos secundarios difiere del aislamiento de las macromoléculas biológicas más abundantes como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, debido a que los metabolitos secundarios son moléculas más pequeñas y químicamente más diversas, además de encontrarse en cantidades menores, por lo que los métodos de aislamiento son diferentes (Cannell, 1998).

Valencia, (1995), menciona que las formas de aislar los principios activos presentes en las plantas son muy diversos entre los que describe: precipitación disolvente-disolvente y extracción líquido-líquido. Para su caracterización recomienda reacciones coloridas, métodos cromatográficos, electroforéticos y de espectrofotometría.

Se ha tratado de conocer la función de los alcaloides en las plantas, considerándose como productos finales del metabolismo del nitrógeno, se asocian a la protección de la planta ante actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, no así para insectos (Domínguez, 1973).

Las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos (Valencia, 1995).

6.6.2 Extracción con Solventes.

El primer paso de la extracción es liberar y solubilizar los metabolitos secundarios a través de la extracción acuosa o con solventes. Esto puede ser hecho por una serie de extracciones, usando solventes de polaridad variable y creciente, los cuales actúan como el primer paso del fraccionamiento o usando un solo solvente "universal" como el metanol, el cual disuelve la mayoría de los productos naturales al mismo tiempo que los libera de la matriz celular. Los materiales insolubles tales como la fibra y otros precipitados, pueden ser removidos mediante filtración o centrifugación (Cannell, 1998).

6.6.3 Identificación química.

Para las mezclas de productos naturales que han sido extraídos con solventes, las pruebas químicas más comunes son las utilizadas para identificar grupos funcionales, que dan una indicación visual de su presencia, cuando un reactivo reacciona con un metabolito y se produce un compuesto colorido (Cannell, 1998).

6.6.3.1 Pruebas Químicas de Identificación de Grupos Funcionales.

Existen métodos químicos para la detección de metabolitos secundarios como la prueba del Br_2/CCl_4 o del KMnO_4 para insaturaciones; para grupo carbonilo la prueba de 2-4-dinitrofenilhidracina, para oxidrilos fenólicos se menciona la reacción con FeCl_3 , para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard y la de Salkowski; para la detección de carbohidratos la prueba de Molish, y la de Dragendorff especialmente usada para la detección de muchas clases de alcaloides (Domínguez, 1973).

6.7 Cultivo de Tejidos Vegetales y Producción de Metabolitos Secundarios

Dentro de la nueva era biotecnológica, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han alcanzado un grado de desarrollo, insospechado hace 20 años. En la actualidad estas técnicas tienen grandes aplicaciones en: agricultura, industria farmacéutica, alimentaria, ya que mediante éstas es posible realizar una propagación clonal de especies vegetales de importancia económica, o en vías de extinción, así como también la obtención de plantas resistentes a patógenos, y metabolitos secundarios aplicables a las industrias antes mencionadas (Katha, 1981).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos únicos para una planta, especie o familia dada, aunque no son imprescindibles para la vida del organismo, contribuyen a la adaptación de las especies a su entorno y a la supervivencia. Los metabolitos secundarios son reconocidos hoy como fuente de medicamentos: sedantes, antiinflamatorios, diuréticos, antivirales; constituyéndose en un negocio muy lucrativo dada las múltiples opciones de tratamiento que ofrece y a la seguridad que representa para el consumidor el uso de productos naturales (Abdelnour, 2006).

Pierik, (1990), define el cultivo "in vitro" de plantas como: el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de semillas, embriones, órganos, explantes,

tejidos, células y protoplastos de plantas. Se caracteriza porque: ocurre a microescala (sobre una superficie relativamente pequeña) optimiza las condiciones ambientales (nutritivas, hormonales, de luz y temperatura), es aséptico, puede inducir un patrón anormal de desarrollo lográndose así la inducción de callo, embriogénesis somática; y permite la manipulación genética al trabajar con células individuales y protoplastos.

Los explantes de casi cualquier parte de la planta o de la semilla pueden formar callo, previa desinfección y colocación en el medio apropiado. Las auxinas en una concentración de moderada a alta son las sustancias primarias de crecimiento para inducir el callo. Como el IAA, el NAA, y el 2,4-D; también deben de suministrarse en cantidades menores las citocininas como la K y la BA (Hartman *et al.*, 1997).

Morales, (2000), utilizó medio MS 1962, adicionado con reguladores de crecimiento: K (Cinetina) 1mg/L con BAP 2 mg/L para germinar e inducir brotes de *Hylocereus undatus* (Cactaceae).

Treviño, (2000), cultivo "in vitro" callo de *Stenocereus griseus* a partir de semillas, utilizando medio MS (1962) adicionado con 5 mg/L de 2,4-D y 5 mg/L de K realizando luego las pruebas químicas de identificación de grupos funcionales, encontrando alcaloides, sesquiterpenlactonas, coumarinas y oxidrilos fenólicos.

Pierick, (1990), recomienda que para la biosíntesis "in vitro" de sustancias se deben utilizar plantas seleccionadas para una elevada producción del metabolito, por lo que es recomendable saber que órgano de la planta es el que presenta mayor cantidad de la sustancia, para de él desarrollar el cultivo de callo. Una vez establecido el callo, se hace un cultivo de células en suspensión y de ahí se deberán seleccionar líneas celulares de alta productividad. Para optimizar la producción de metabolitos se pueden agregar al medio precursores o promotores del metabolito, así como el control de los factores físicos (luz, temperatura, agitación). Un factor relacionado directamente con la producción de metabolitos es la tasa de duplicación celular, si esta es alta la producción también lo será, por desgracia en vegetales es de 16 a 24 h, una alternativa sería modificar este factor.

Reinert and Yeoman, (1982), hacen referencia de que los cultivos de células vegetales pueden acumular una serie de metabolitos secundarios como los polifenoles, alcaloides, esteroides y pigmentos y algunos de ellos se acumulan en el medio e inhiben el crecimiento, como los polifenoles. En sus investigaciones también recomiendan para ciertas especies el cultivo de callo para obtener metabolitos secundarios y para otras el cultivo de células en suspensión.

Blanco *et al.*, (2004), llevaron a cabo la micropropagación de *Dracaena deremensis*, debido al problema de oxidación de los explantes, probaron una técnica donde la solución desinfectante que utilizaron (NaOCl) le agregaron 100 mg/L de ácido ascórbico, reduciendo así en gran medida la oxidación de los tejidos durante la disección e inoculación "in vitro" de los explantes.

Piñol, (1999), menciona que aunque existen problemas para la producción de metabolitos secundarios a través de la técnica de cultivos vegetales, como la baja productividad del compuesto deseado, esto se puede incrementar al elegir líneas genéticamente de alta productividad, o bien optimizando las condiciones físicas y químicas del cultivo. En Japón se ha producido "in vitro" en un biorreactor de 20,000 L una cantidad de ginseng que "in vivo" requeriría de 5 a 7 años y 600 ha de la planta para una producción similar.

Arias *et al.*, (1992), mencionan que los primeros metabolitos secundarios detectados en cultivo de tejidos, fueron descubiertos por Gautheret en 1942 en cultivo de callo. También hacen mención de que la desdiferenciación del tejido de la planta con la finalidad de obtener el cultivo de células en suspensión, va acompañado por una aparente pérdida de la habilidad de acumular el metabolito, debido a: 1) carencia de expresión en las células no especializadas de los genes que regulan la ruta de la biosíntesis, 2) uso del sustrato en otras rutas que no son del metabolismo secundario, 3) ausencia de mecanismos de transporte para remover del sitio de la biosíntesis productos tóxicos, 4) falta de sitios para almacenar el metabolito secundario y 5) catabolismo no regulado del metabolito sintetizado.

Mantell and Smith, (1983), reconocieron la utilidad del sistema de cultivo de tejidos vegetales al servir como fuente de nuevas plantas y metabolitos de importancia económica para el hombre.

Carvajal *et al.*, (2001), compararon la producción de alcaloides de *Uncaria tomentosa*, entre tejidos "in vivo" y tejidos cultivados "in vitro", observando que en los cultivos "in vitro" la producción de alcaloides fue influenciada por las auxinas, por ejemplo el ácido indolacético promueve la formación de alcaloides de tipo indol y oxindol en células cloróticas, mientras que el 2,4-D lo suprime. Concluyendo que las plantas y los tejidos diferenciados producen más alcaloides que los tejidos indiferenciados.

Topete *et al.*, (1991), consideran al cultivo de tejidos como una de las alternativas más importantes para obtener metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son difíciles de sintetizar por vía química. Ellos hacen mención que el primer metabolito producido por la técnica de cultivo de tejidos a escala comercial, fue la chiconina, producto usado como colorante en cosmetología y en la industria del vestido y como fármaco auxiliar en el tratamiento de heridas y quemaduras.

Marapara *et al.*, (1999), lograron la producción del alcaloide magnoflorina de interés en el control HIV-1, a partir de cultivo de callo de *Delphinium staphisagria*. Ellos desinfectaron las semillas y las hicieron germinar en MS (1962) adicionado con reguladores de crecimiento, logrando la inducción de callo, e iniciando un protocolo de extracción de alcaloides con etanol para extractos orgánicos. Resultando el mejor medio el adicionado con K y ANA y el mejor eluyente, hexano-diclorometano-metanol (1:3:6).

Hurtado y Merino, (1991), Mencionan que la capacidad de crecimiento y la morfogénesis de los tejidos depende y se ve favorecida por varios factores: tipo y

concentración de reguladores del crecimiento (auxina, citocinina), sustitución de sacarosa por glucosa, adición de vitaminas del complejo B, componentes endógenos del explante.

Angeles *et al.*, (2001), lograron la producción de camptotecina (alcaloide monoterpeneo con propiedades anticancerígenas y antiretrovirales), a partir de cultivo de células en suspensión obtenido de callos friables de *Camptotheca acuminata*.

Luna *et al.*, (2001), trabajaron con cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) planta conocida por su potente actividad estimuladora gracias a la presencia de alcaloides oxindólicos. Usaron medio MS para ver la influencia de los requerimientos nutricionales, de los reguladores de crecimiento y de elicitores bióticos en la síntesis de alcaloides. Los cultivos sometidos a medio MS con cinetina, sucrosa y ácido indolacético formaron alcaloides oxindólicos semejantes a los de la corteza de la planta. Por otro lado los sometidos al mismo medio pero con cinetina, sucrosa, IAA o bajas concentraciones de 2,4-D y ácido jasmónico (como elicitores), inducen exclusivamente alcaloides indólicos.

Navia, (1999), demostraron la importancia de ciertas sustancias que actúan como elicitores, en la biosíntesis de algún metabolito a nivel "in vitro", ellos trabajaron con cultivo de células en suspensión de *Taxus baccata* y *T. media*, para inducir la síntesis de taxol baccatina III, utilizando como elicitores al sulfato de vanadilo, el metiljasmonato y el ácido araquidónico, los cuales adicionaron al medio de cultivo.

Osuna *et al.*, (2001), utilizaron *Galphimia glauca* que es una planta empleada en la medicina tradicional mexicana para tratar trastornos nerviosos. El producto activo (sedativo) es la galfimina B, con base a este conocimiento, los autores establecieron un cultivo de callo a partir de hipocotilos de *G. glauca*, para luego desarrollar el cultivo de células en suspensión, modificando las condiciones de cultivo y los reguladores de crecimiento suministrados a un medio MS (1962), el cultivo de células en suspensión se mantuvo en matraces Erlenmeyer a 115 rpm, primeramente incrementaron biomasa y luego la producción de la galfimina B, las variables cuantificadas fueron peso húmedo y seco, pH, consumo de carbohidratos y metabolito, concluyendo que esta forma de cultivo de células puede ser una buena alternativa para la obtención de fármacos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Reactivos, Material y Equipo.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, el equipo utilizado fue incubadora de CO₂, microscopio invertido Mod. D Carl Zeiss, lector de microplacas EIA multiwell reader (Sigma), sonicador, centrífuga refrigerada (Damon/IEC, USA), placas de agitación y calentamiento (Corning USA), hemocitómetro (American Optical SI), microplaca estériles de poliestireno de 96 pozos (Sigma), liofilizador; agitador Dual Action Shaker Lab Line, rotavapor Büchi 461, balanza analítica y granataria, potenciómetro, autoclave, campana de flujo laminar y cuarto de cultivo.

7.2 Material Vegetal

Las plantas fueron obtenidas de su lugar de origen, Baja California Sur, y mantenidas en condiciones de laboratorio para su procesamiento y utilización. De la especie *S. gummosus* también fueron obtenidos frutos maduros, para la obtención de semilla.

Se utilizaron tallos de *L. schottii* y semillas obtenidas de frutos maduros de *S. gummosus*, para obtención de explantes para los cultivos "in vitro", para obtener los extractos solo se utilizaron tallo de ambas plantas y el tejido regenerado "in vitro".

7.3 Obtención de Extractos de especies vegetales

7.3.1 Acuoso

Para la liofilización se siguió el procedimiento siguiente: se pesaron 100 g de cada planta (sin espinas), se colocan en 2 L de agua hirviendo, hasta reducción de la mitad del líquido, se enfrió y se filtró con un filtro Whatman # 3. Se pasó a los vasos de liofilización que luego se congelaron, para posteriormente pasar al liofilizador (Bravo y Scheinvar, 1995).

7.3.2 Extracto Metanólico

Se obtuvieron 30 g de tallo de ambas especies, el cual se trituró en un molino tipo "Wiley", este macerado se agregó a 100 mL de metanol (mayor polaridad) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se colocó en un agitador Dual Action Shaker Lab Line, por un periodo de 7 días, posteriormente el extracto se filtro sobre papel Wathman, No.1 y el solvente se evaporó con presión reducida con un Rotavapor Büchi 461 y luego por evaporación a temperatura ambiente se terminó de obtener el extracto. Para el tejido "in vitro" se pesó el material obtenido, se maceró, se le agregó la proporción correspondiente de solvente y se siguió el mismo procedimiento anterior.

7.4 Material Biológico

7.4.1 Cultivo de Cepas Bacterianas

Las cepas fueron obtenidas del laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, y fueron las siguientes: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25619, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*.

El método que se utilizó para determinar la actividad antimicrobiana fue el de difusión en placa con discos de papel filtro. Las soluciones probadas fueron esterilizadas por el método de filtración, usando membranas de 0.25 μm (Koneman *et al.*, 1989).

Para la activación de los cultivos se utilizó el medio líquido (Rivas, 1998) (Patente en trámite 9810892 UANL) a base de peptona de colágeno, extracto de levadura y agar. El medio se preparó con 5 g de medio C. Rivas en 100 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7, el medio se colocó en tubos de ensaye de 18 x 150, a cada tubo le agregó 5 mL de medio se esterilizó con calor húmedo (15 lb/10 minutos) para luego inocularlas con las cepas bacterianas seleccionadas, se incubaron de 12 a 18 h a 37 °C.

El cultivo de bacterias se estableció en el medio sólido C. Rivas, se pesó 8.5 g en 100 mL de agua destilada, luego se esterilizó con calor húmedo y se sembró en cajas de petri (20 mL por caja). Se sembraron estas cajas petri con 100 µL del inóculo con una micropipeta Eppendorf y se difundió homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 µL del extracto y un control negativo con etanol, y un control positivo con cloranfenicol, se incubaron durante 18-24 h a 37 °C, después de este período se midió el halo de inhibición formado (Sánchez, 1995).

7.4.2 Cultivo del Crustáceo *Artemia salina*.

Para la incubación de huevecillos de *A. salina*, (Figura 3) se elaboró agua de mar artificial, de la manera siguiente: Se pesan 40 g de sal de mar (Instant Ocean, Aquarium System), 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson) se aforaron en un litro de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.8). El procedimiento se realizó incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz (Figura 4). A las 24 h los nauplios fueron pasados con la ayuda de una micropipeta a otro recipiente y mantenidos en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 h más. En una microplaca de 96 pozos fueron adicionados 100 µL de la suspensión de nauplios/pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 µL de las diluciones de los extractos a probar, las concentraciones probadas estuvieron en un rango de 10 a 1000 µg/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. A las 24 h de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis. Utilizando el método Probit se determinó la LD₅₀ (Meyer *et al.*, 1982; Solís *et al.*, 1993).

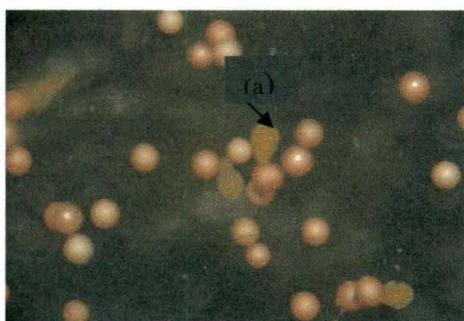


Figura 3. Huevecillos de *A salina* en agua salada, algunos eclosionando (a)



Figura 4. Nauplios de *A salina* en agua salada.

7.4.3 Cultivo de Líneas Celulares:

Se emplearon líneas celulares proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS. Estas líneas fueron: MCF-7 Adenocarcinoma, glándula mamaria (ATCC HTB-22) y HeLa Cáncer cérvico uterino (ATCC CCL-2).

El medio utilizado fue: MEM con suero fetal bovino 10%, para ambas líneas celulares (Freshney, 2000).

Las líneas se mantuvieron en congelación en nitrógeno líquido, para su descongelación, los criotubos se descongelaron en baño maría, se diluyeron en medio de cultivo, se centrifugaron para eliminar el medio y la suspensión celular se distribuyó en botellas de cultivo de 25 cm² con 4 mL de medio. Para determinar su viabilidad una pequeña muestra de las células se coloca en un portaobjetos más una gota de azul de tripano, las células muertas toman una coloración azul mientras que vivas se ven refringentes. Las botellas de cultivo son colocadas en una incubadora con atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y temperatura de 37 °C.

Una vez establecido el cultivo en monocapa, se procede a sembrar en microplacas de 96 pozos para determinar la actividad citotóxica de los extractos. En condiciones asépticas se eliminó el medio del frasco con vacío, se lavaron dos veces con PBS (buffer de fosfatos salino) se elimina con vacío, se les agregó 2 mL de tripsina al 0.25% y se incubaron por 10 min, posteriormente se les agregó 10 mL de medio y se pasaron a un tubo cónico de 15 mL, se centrifugaron por 10 min a 1000 rpm a 25 °C, y se retiró el sobrenadante, dejando solo 5 mL, se resuspendió suavemente, hasta homogeneizar (una muestra fue depositada en el hemocitómetro para el conteo y otra en un portaobjetos para verificar viabilidad con azul de tripano). Se preparó una suspensión celular para sembrar 3000 células/pozo en un volumen de 100 µL que se adicionó a microplacas de 96 pozos, mismas que fueron incubadas a 37 °C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por

24 h, posteriormente se agregaron 100 μ l de cada una de las concentraciones de los extractos en rango de 10 a 120 μ g/mL, volviéndose a incubar por 48 h. Como control positivo se utilizó taxol, como controles negativos PBS mas medio con la línea celular, extracto mas medio, medio únicamente, lo anterior para usar como referencias en las absorbancias leídas. Al cabo de este tiempo a cada pozo de las placas se les adicionó 10 μ l del reactivo WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1 1644-807) y se incubaron por 90 min a 37 °C. Pasado este tiempo se colocaron las microplacas en un lector (EIA Multiwell reader Sigma Diagnostics) y se leyeron a 450 nm de longitud de onda y un diferencial de 600 nm para determinar su absorbancia, la cual es directamente proporcional al número de células viables. A partir de esta absorbancia se determinó el porcentaje de viabilidad de cada línea celular probada con los extractos y la IC₅₀ (Freshney, 2000).

7.5 Pruebas Químicas de Identificación de Grupos Funcionales.

Para la determinación inicial de los compuestos presentes en los extractos se realizaron las pruebas químicas de identificación. Las soluciones utilizadas fueron a 50 mg/mL de los extractos disueltos en metanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos (Domínguez, 1976).

7.5.1 Prueba del (KMnO₄).

Se prepara una solución de KMnO₄ al 2% en agua. Se aplica una gota a uno de los pozos de la placa y se pone una gota de la solución del extracto. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de manganeso.

7.5.2 Prueba del FeCl₃.

Se coloca una gota de la solución del extracto, después se añaden unas gotas de FeCl₃ al 12.5 % en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

7.5.3 Prueba de Liebermann-Burchard.

Determina triterpenos y compuestos esteroidales. Se coloca una gota del extracto sobre uno de los doce pozos de la placa de porcelana, se deja evaporar el solvente y se le agrega una gota de cloroformo y una gota del reactivo (1 gota de ácido sulfúrico se agrega a una mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo a 0 °C), si hay formación de colores azul, verde, rojo y anaranjado, los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva.

7.5.4 Prueba de Salkowski.

Determina esteroides y metilesteroides, parecida a la anterior, la solución del extracto se pone en contacto con una gota de cloroformo y una de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

7.5.5 Prueba de Molish.

Para determinar carbohidratos. En un tubo de ensayo se colocan 1-2 mL de la muestra se le agrega gota a gota (3 gotas) el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en 100 mL de etanol), luego 2 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

7.5.6 Prueba del NaOH.

Se usa para determinar cumarinas y lactonas Se disuelve 1-2 mL de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

7.5.7 Prueba de Baljet.

Para determinar sesquiterpenlactonas. A 2-3 mL. del compuesto se le agregan 3-4 gotas de la **solución mezcla** (solución A que contiene: ácido pícrico al 1 % en etanol y una B: NaOH al 10 %.), siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura.

7.5.8 Prueba del H₂SO₄

Para flavonoides. Un mL de la muestra, se disuelve en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas.

7.5.8 Prueba de Shinoda.

Identifica compuestos tipo flavonoide. A un mL de la muestra se le agregan limaduras de magnesio, se calienta a 60°C, se le agrega unas gotas de HCl por las paredes. Es positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul o violeta.

7.5.9 Prueba de Dragendorff

Para alcaloides Modificación de Munier y Machelobuf. Se harán 2 soluciones. Solución A se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Solución B se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides si se obtiene una coloración, rojo o naranja, persistentes por 24 h.

7.5.11 Prueba de Saponinas

Se colocaron 2 mL de la muestra en un tubo de ensaye de 13 x 150 se le agrega bicarbonato de sodio, se agita y la aparición de espuma es positivo para la presencia de saponinas.

7.6 Cultivo "in vitro" de especies vegetales.

7.6.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el Murashige & Skogg (MS) 1962 sólido, el cual se elaboró a base de sales minerales, con alta proporción de nitratos, compuestos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores de crecimiento disueltos en agua bidestilada, como agente solidificante se usó Agar. Algunos compuestos como se usan en proporciones muy pequeñas, requieren su elaboración en soluciones stock o substock. Tablas I, II y III. El medio se esteriliza a 15 lb/15 minutos y después se almacena en refrigeración.

TABLA I
Sales básicas y compuestos orgánicos del medio MS(1962)

		mg/L
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Cloruro de calcio	440
CaCl ₂	Cloruro de calcio (anhidro)	332
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170
MICROELEMENTOS		
Na ₂ EDTA	EDTA-disódico	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato ferroso	27.8
H ₃ BO ₃	Acido bórico	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	Sulfato de manganeso	16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de zinc	8.6
KI	Yoduro de potasio	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Molibdato de zinc	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS		
Mio-inositol		100
Tiamina		4
Acido nicotínico		1
Piridoxina		1
Sacarosa		30g/L
Agar		7g/L
Reguladores de crecimiento		BAP 2 mg/L K 1 mg/L

TABLA II
Componentes de las soluciones stock y substock para el medio MS
(1962)

SOLUCIÓN A	CaCl ₂ · 2H ₂ O	22 g
SOLUCIÓN B	KNO ₃	1.9 g/L
	NH ₄ NO ₃	1.65 g/L
SOLUCIÓN C * Preparar una solución con 2.5 mg/L y tomar 0.5 mL para la solución	KI	41.5 mg
	*CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.25 mg
SOLUCIÓN D ** Preparar una solución con 25 mg/L y tomar 0.2 mL para la solución	KH ₂ PO ₄	3.4 g
	H ₃ BO ₃	0.124 g
	**Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	5.0 mg
SOLUCIÓN E *** Preparar una solución con 2.5 mg/L y tomar 0.2 mL para la solución	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.4 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.338 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.172 g
	***CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5 mg
SOLUCIÓN F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.557 g
	Na ₂ EDTA	0.745 g
SOLUCIÓN G **** Preparar una solución con 2.5 mg/L y tomar 1.0 mL para la solución	Glicina	50 mg

TABLA III
Procedimiento para elaborar 1 L de medio MS(1962)
con las soluciones concentradas.

Compuesto	Cantidad por L
SOLUCIÓN A	1 mL
SOLUCIÓN B	KNO ₃ 1.9 g
	NH ₄ NO ₃ 1.65 g
SOLUCIÓN C	1 mL
SOLUCIÓN D	2.5 mL
SOLUCIÓN E	2.5 mL
SOLUCIÓN F	5 mL
SOLUCIÓN G	10 mL
REGULADORES DEL CRECIMIENTO	BAP 2 mg/L K 1 mg/L
MYO-INOSITOL	100 mg
SACAROSA	30 g
AJUSTAR pH a 5.7	
AFORAR A 1000 mL	
AGAR	7 g

7.6.2 Establecimiento del Cultivo "in vitro"

7.6.2.1 *S. gummosus*

Para la obtención de explantes de esta especie, por su facilidad se utilizaron semillas que se extrajeron de frutos frescos, siendo sometidas a escarificación con ácido clorhídrico concentrado por 30 segundos, posteriormente se procedió a su desinfección con Cloralex (v/v) al 10 % por 15 min, seguido de un lavado en agua estéril en la CFL y fueron sembradas en medio MS según Murashige T. and F. Skoog. (1962), adicionado con BAP (Bencilaminopurina) 2 mg/L y K (Cinetina) 1 mg/L y colocadas bajo condiciones de luz (12 h) y temperatura controlada en un rango de 24 a 26 °C (Avilés, 2001; Morales, 2000).

7.6.2.2 *L. schottii*

Debido a que no se pudieron conseguir frutos de esta especie se procedió a usar explantes vegetativos tomando secciones de tallo, aerólas y tejidos internos. Se usaron dos variantes de procedimientos de desinfección y medio MS adicionado con reguladores de crecimiento y ácido ascórbico: 1) Los explantes fueron lavados profusamente en agua corriente y luego se procedió a darles una inmersión rápida en alcohol etílico absoluto (10 seg), para pasarlos a una solución de Cloralex (v/v) al 15 % con unas gotas de tween 20 por 10 min, luego un lavado con agua estéril en la CFL. Se sembraron en un medio MS adicionado con BAP 2 mg/L y K 1 mg/L y se colocaron bajo condiciones de luz (12 h) y temperatura controlada (24-26 °C). 2) Igual al anterior, pero la solución de etanol fue a 70 % y a la solución de cloralex le agregamos 100 mg/L de ácido ascórbico y fueron sembrados en un medio MS con los mismos reguladores de la primera técnica y adicionado con 50 mg/L de ácido ascórbico (Blanco *et al.*, 2004).

8. RESULTADOS

8.1 Material vegetal

Tallos secos con flores fueron montados y entregados al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para su depósito e identificación, extendiendo este el voucher correspondiente para ambas especies, para *S. gummosus* el folio 024186 y para *L. schottii*, el folio 024185. El resto del material vegetal se conservó para la elaboración de extractos y los cultivos "in vitro".

8.2 Obtención de Extractos, Rendimiento en la Extracción del Material.

De 100 g liofilizados de tallos de *L. schottii* se tuvo un rendimiento total de 1.6 % y de *S. gummosus* fue de 1.8 %. El rendimiento de los extractos metanólicos para 30 g de tallo de *L. schottii* fue de 1.61% y para *S. gummosus* 1.7 %.

Especie/tejido	% rendimiento acuoso	% rendimiento metanólico
<i>L. schottii</i>	1.6	1.61
<i>S. gummosus</i>	1.8	1.7

Material Biológico

8.3.1 Actividad Antimicrobiana sobre Cepas Bacterianas

El extracto metanólico de *L. schottii* dió positivo en la prueba de inhibición de crecimiento (Figura 7) para todas las cepas bacterianas excepto en *Pseudomonas aeruginosa*. (Tabla IV). El extracto metanólico de *S. gummosus* así como los liofilizados de ambas especies no presentan actividad.

TABLA V

Efecto del extracto metanólico de *L. schottii* sobre bacterias de importancia médica. *Pseudomonas aeruginosa* Pa, *Salmonella typhi* St, *Enterobacter aerogenes* Ea, *Listeria monocitogenes* Lm.

Extracto/controles *	Pa.	St.	Ea.	Lm.
Metanólico	-	+	++	+
Etanol *	-	-	-	-
Cloranfenicol *	+++	+++	+++	+++

Se sembraron cajas petri con 100 μ L del inóculo de cada cepa con una micropipeta Eppendorf y se difundió homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 μ L del extracto y un control negativo con etanol, y un control positivo con cloranfenicol, se incubaron durante 18-24 h a 37 °C, después de este período se midió el halo de inhibición formado. Presentando la mayor actividad inhibitoria el extracto metanólico sobre *Enterobacter aerogenes*.

8.3.2 Actividad Citotóxica sobre *Artemia salina*.

No se obtuvo actividad citotóxica sobre *A. salina* con los extractos acuosos de ambas especies ni con el metanólico de *S. gummosus* hasta una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado los extractos metanólicos de *L. schottii* resultaron eficaces, con una LD_{50} de 64.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con D.S. 14.3 con un limite de confianza o rango de 50.57 a 78.87. (Figura 5).

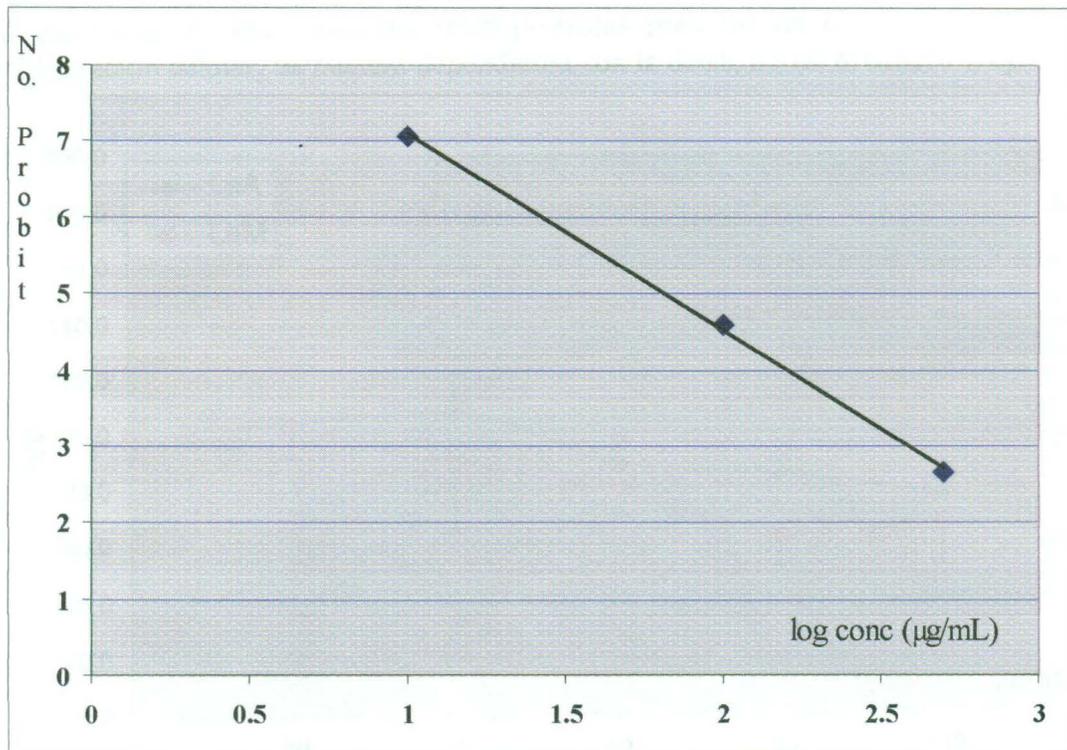


Figura 5. Actividad citotóxica de los extractos metanólicos de *L. schottii* sobre *A. salina*. LD_{50} 64.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Determinado por el método Probit.

8.3.3 Actividad citotóxica sobre las Líneas Celulares:

8.3.3.1 Línea celular MCF-7

La citotoxicidad de los extractos metanólico y acuoso de *L. schottii* sobre las células MCF-7, fue $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 6). Por otro lado el extracto metanólico de *S. gummosus* en las concentraciones probadas presentó un efecto positivo sobre la proliferación celular, de manera dependiente con la dosis, no así el acuoso (Figura 7).

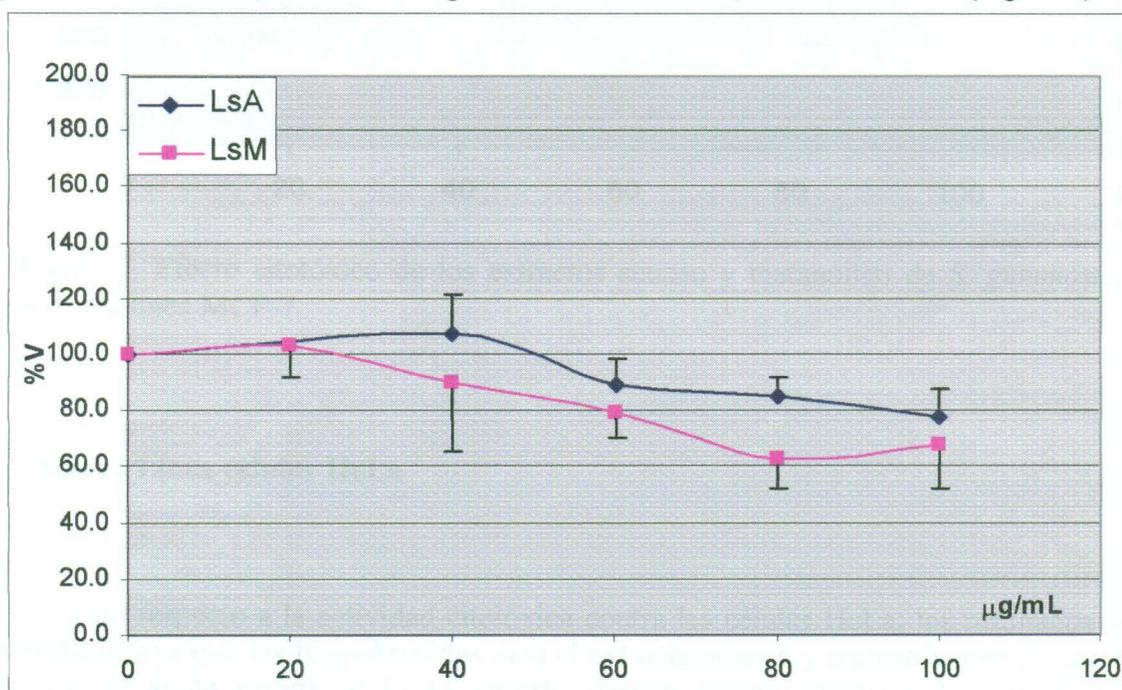


Figura 6. Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *L. schottii* sobre la línea celular MCF-7.

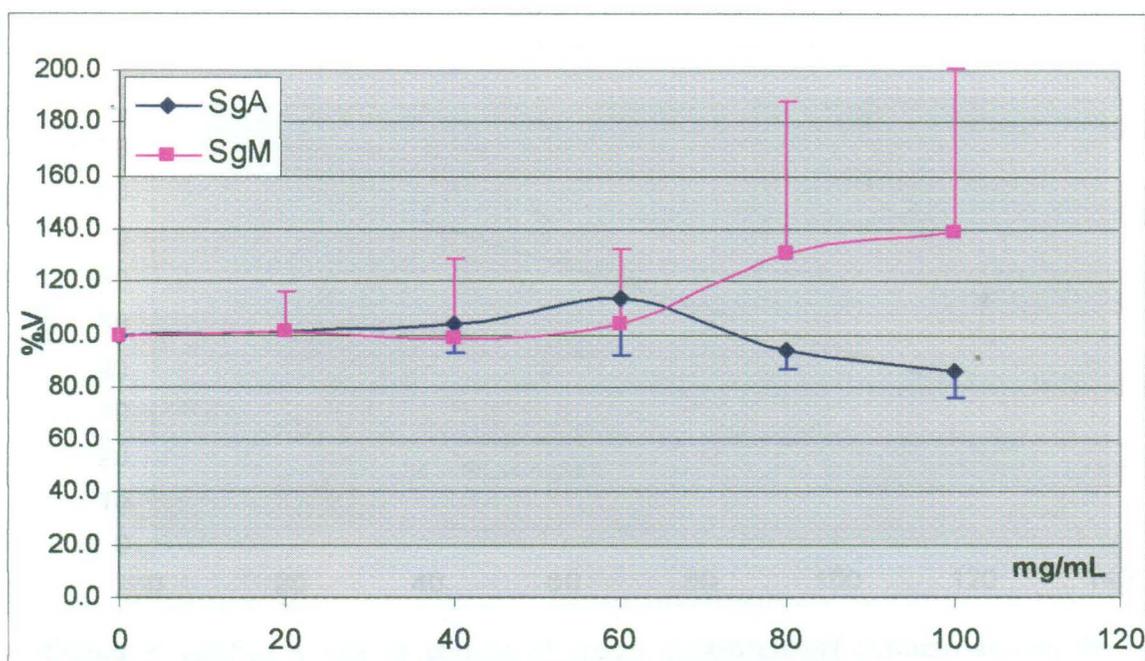


Figura 7. Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *S. gummosus* sobre la línea MCF-7.

8.3.3.2 Línea celular HeLa

Con respecto a la actividad citotóxica contra las células HeLa, los resultados son alentadores ya que las IC_{50} obtenidas para el extracto acuoso y metanólico de *L. schottii* fueron de $86.44 \mu\text{g/mL}$ y $11.44 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (Figuras 8 y 9). Para *S. gummosus* no se reporta actividad citotóxica para ambos extractos.

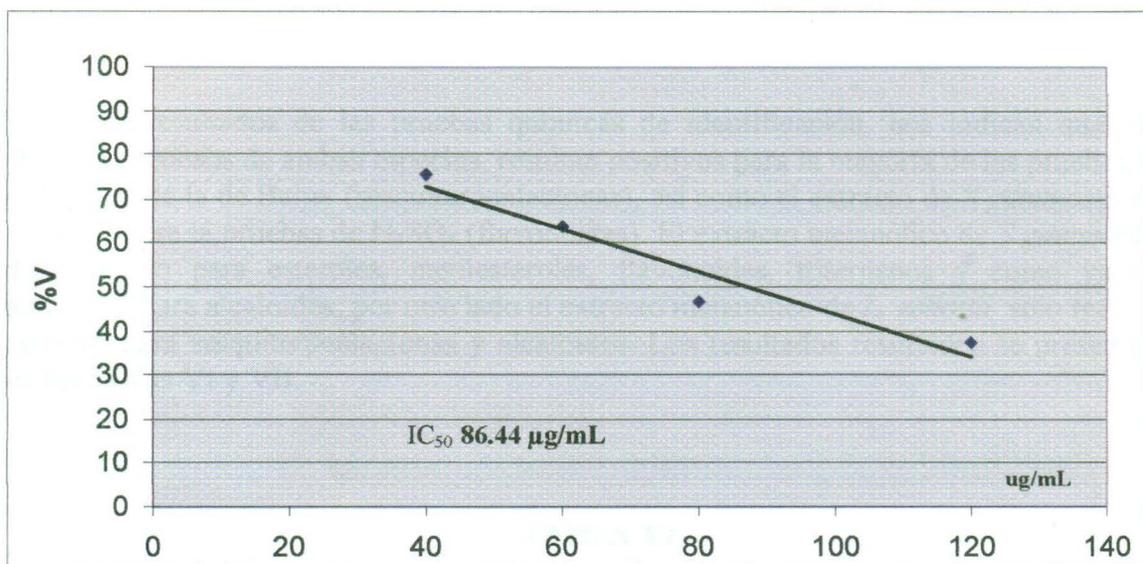


Figura 8. Gráfica donde se aprecia el efecto citotóxico del extracto acuoso de *L. schottii* sobre células HeLa, IC_{50} 86.44 $\mu\text{g/mL}$.

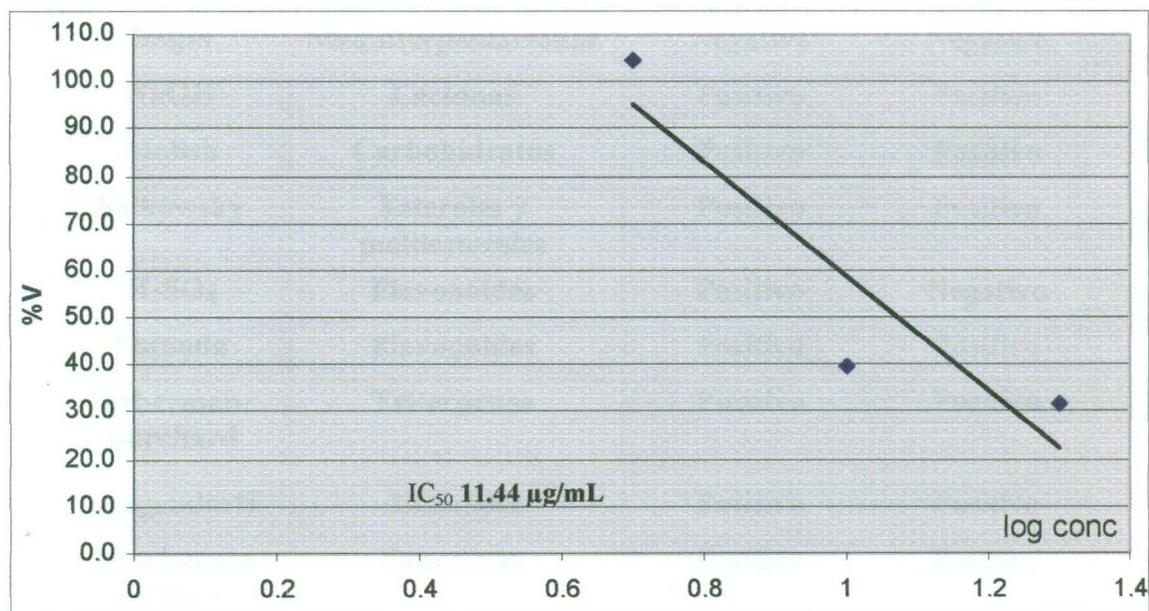


Figura 9. Gráfica donde se aprecia el efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. schottii* sobre células HeLa, IC_{50} de 11.44 $\mu\text{g/mL}$.

8.4 Pruebas Químicas de Identificación de Grupos Funcionales

Los resultados de las pruebas químicas de identificación, nos indican que los extractos acuosos de ambas especies, resultan positivos para la mayoría de las pruebas, a excepción de la de Baljet (sesquiterpenlactonas), así como el extracto de *S. gummosus* es negativo para la pruebas de H₂SO₄ (flavonoides). El extracto metanólico de *S. gummosus* dio positivo para esteroides, metilesteroides, flavonoides, triterpenos y como ya se mencionó para alcaloides; por otro lado el extracto metanólico de *L. schottii* solo resultó positivo para sesquiterpenlactonas y alcaloides. Los resultados resumidos se presentan en las Tablas VI y VII.

TABLA VI
Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos acuosos de *L. schottii* y *S. gummosus*

Pruebas	Grupo funcional	<i>L. schottii</i>	<i>S. gummosus</i>
FeCl ₃	Oxidrilos fenólicos	Positivo	Positivo
Baljet	Sesquiterpenlactonas	Negativa	Negativo
NaOH	Lactonas	Positivo	Positivo
Molish	Carbohidratos	Positivo	Positivo
Salkowsky	Esteroides y metilesteroides	Positivo	Positivo
H ₂ SO ₄	Flavonoides	Positivo	Negativo
Shinoda	Flavonoides	Positivo	Positivo
Lieberman-Burchard	Triterpenos	Positivo	Positivo
Dragendorff	Alcaloides	Positivo	Positivo
Bicarbonato de Sodio	Saponinas	Positivo	Positivo

TABLA VII

Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos metanólicos de *L. schottii* y *S. gummosus*

Pruebas	Grupo funcional	<i>L. schottii</i>	<i>S. gummosus</i>
FeCl ₃	Oxidrilos fenólicos	Negativo	Negativo
Baljet	Sesquiterpenlactonas	Positivo	Negativo
NaOH	Lactonas	Negativo	Negativo
Molish	Carbohidratos	Positivo	Positivo
Salkowsky	Esteroles y metilesteroles	Negativo	Positivo
H ₂ SO ₄	Flavonoides	Negativo	Positivo
Shinoda	Flavonoides	Negativo	Negativo
Lieberman-Burchard	Triterpenos	Negativo	Positivo
Dragendorff	Alcaloides	Positivo	Positivo
Bicarbonato de Sodio	Saponinas	Negativo	Negativo

8.5 Cultivo "in vitro" de Especies Vegetales

8.5.1 *S. gummosus*

Las semillas cultivadas "in vitro" germinaron y la formación de callo inició cuando los brotes alcanzaron más de 1 cm de longitud (Figura 10), en estos se comenzaron a apreciar cambios morfogénéticos dando lugar al tejido desdiferenciado del callo (Figura 11), el material obtenido fue muy abundante de un color verde y friable, el cual se utilizó para obtener un extracto metanólico. (Figura. 11 y 13)



Figura 10. Plántulas de *S. gummosus* obtenidas por germinación "in vitro" en medio MS (1962).



Figura 11. Brotes de *S. gummosus* en proceso de desdiferenciación para formar callo, en medio MS (1962).

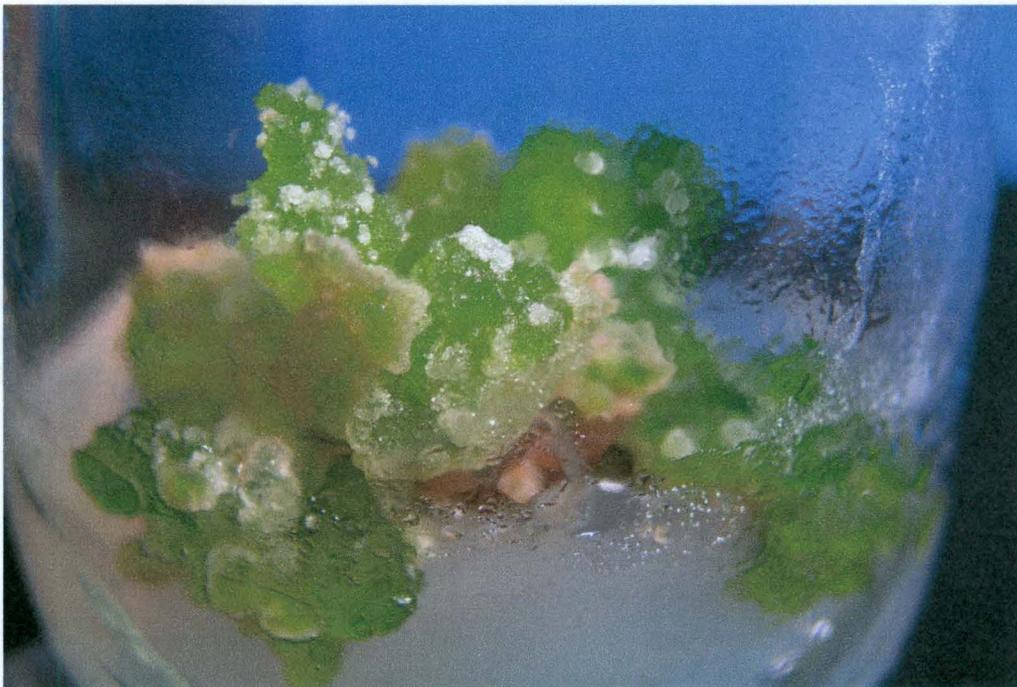


Figura 12 Callo de *S. gummosus*, creciendo en medio MS (1962).

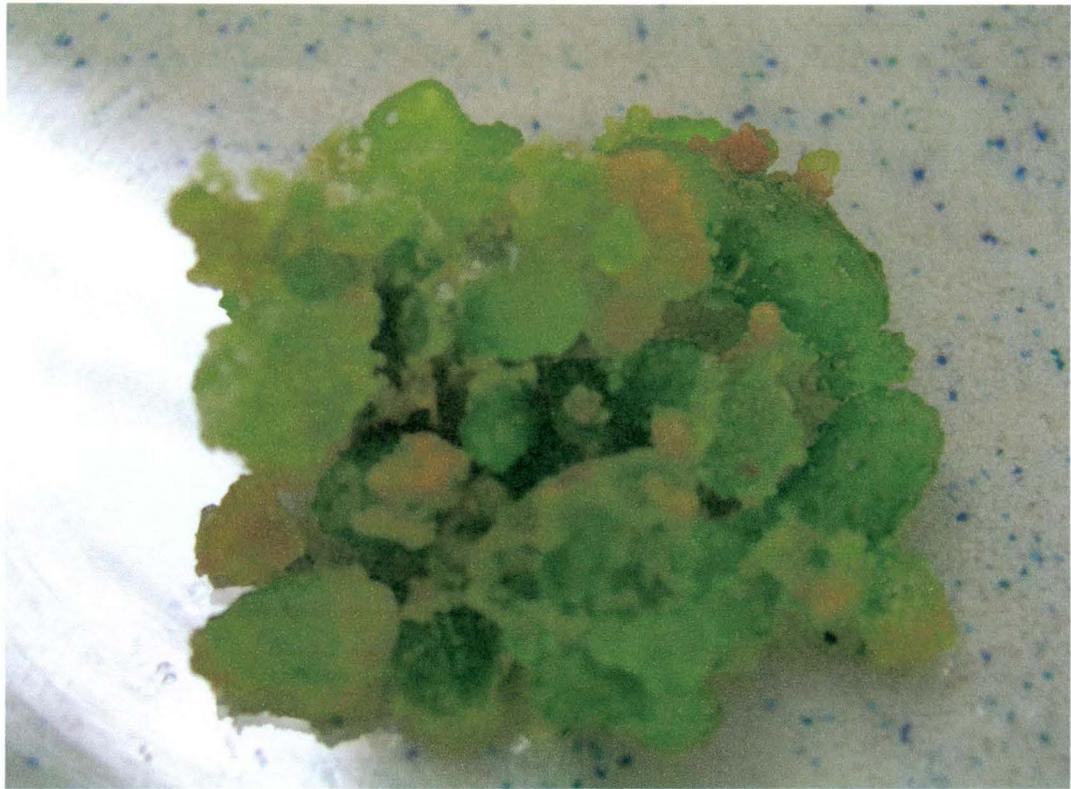


Figura 13. Callo de *S. gummosus* para maceración y obtención de extracto.

8.5.2 *L. schottii*

En cuanto a desarrollo morfogénético no se tuvieron los resultados deseados con el cultivo "in vitro" de esta especie, debido a la oxidación que presentan los tejidos una vez cortados y colocados en el medio, problema que subsistió a pesar de agregar ácido ascórbico al medio y al proceso de desinfección, solo un explante procedente de una areóla lateral (Figura 14), produjo un callo pequeño, de color café claro y cristalino (Figura 15).

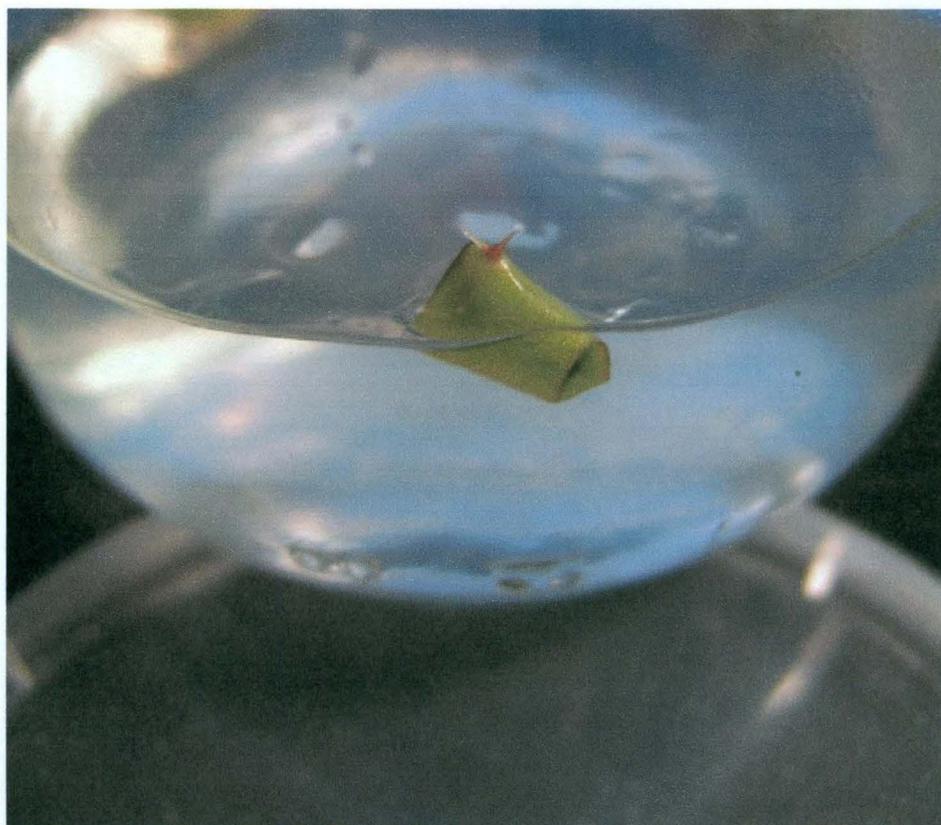


Figura 14. Areóla lateral de *L. schottii* en medio MS (1962).

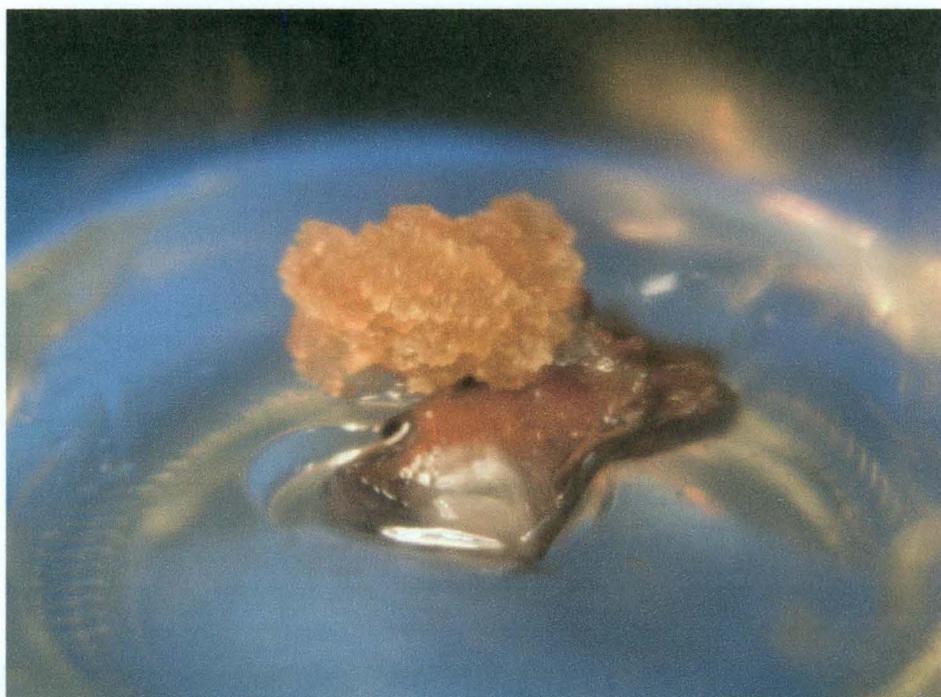


Figura 15. Callo de *L. schottii* formado a partir de una areóla lateral en medio MS (1962).

8.5.3 Pruebas Químicas de Identificación de Grupos Funcionales en tejidos "in vitro".

El callo obtenido de *L. schottii*, tuvo muy poco desarrollo por lo que fue imposible llevar a cabo pruebas posteriores de identificación de compuestos.

Por otro lado el callo obtenido de *S. gummosus* tuvo un rendimiento de 2.93 %, de un peso inicial de 17.0288 g.

En cuanto a los estudios químicos para la determinación de grupos funcionales del callo de *S. gummosus* se observó que todas las pruebas fueron positivas excepto la de Shinoda para flavonoides (Tabla VIII).

TABLA VIII
Resultados de pruebas químicas de identificación de grupos funcionales en extractos metanólicos de callo de *S. gummosus*

Pruebas	Grupo funcional	Extracto metanólico de callo <i>S. gummosus</i>
FeCl₃	Oxidrilos fenólicos	Positivo
Baljet *	Sesquiterpenlactonas	Positivo
NaOH	Lactonas	Positivo
Salkowsky	Esteroles y metilesteroles	Positivo
H₂SO₄	Flavonoides	Positivo
Molish	Carbohidratos	Positivo
Shinoda	Flavonoides	Negativo
Lieberman-Burchard	Triterpenos	Positivo
Dragendorff	Alcaloides	Positivo
Bicarbonato de Sodio	Saponinas	Positivo

9. DISCUSIÓN

El propósito principal de este trabajo de investigación fue determinar la actividad antibacteriana y antineoplásica de extractos acuosos y metanólicos de *L. schottii* y *S. gummosus*, así como establecer el cultivo "in vitro" de ambas especies vegetales en base a los resultados de la actividad citotóxica.

Existen reportes sobre la actividad antimicrobiana de *L. schottii* sobre *Escherichia coli* y *Salmonella thypi* y otros microorganismos (Rico-Bobadilla *et al.*, 2001; Fimbres y García, 1998), esto puede relacionarse con la actividad antibacteriana que presentó el extracto metanólico de esta especie sobre las cepas de bacterias *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes*.

El bioensayo de letalidad de *A. salina* es utilizado por ser sencillo y económico para la búsqueda primaria de compuestos citotóxicos en extractos crudos de plantas y organismos marinos (Meyer *et al.*, 1982). En el presente trabajo el extracto metanólico de *L. schottii* resultó citotóxico para este crustáceo así como para la línea celular HeLa. No así el extracto acuoso de esta misma especie, que si resultó citotóxico contra esta misma línea celular pero no para *A. salina*. Dada la presencia de compuestos tipo triterpenos en el tallo de *S. gummosus* reportados por Bravo y Sánchez, (1978) y Bravo y Scheinvar, (1995), se presumiría una acción citotóxica de sus extractos, resultado que no se presento con ninguno de los extractos de esta especie sobre las líneas celulares MCF-7 y HeLa y sobre el crustáceo *A. salina*.

Con el extracto metanólico de *S. gummosus* en las concentraciones probadas (60, 80 y 100 µg/mL) se observó un efecto positivo sobre la proliferación celular sobre la línea celular MCF-7, aumentando los porcentajes de viabilidad conforme se elevaba la dosis, condición similar a la encontrada por Silva, (2005) en extracto etanólico de *Schinus molle* sobre la línea celular CHANG y OK, debido probablemente a la presencia de factores de crecimiento en el extracto.

Algunos investigadores han trabajado con compuestos de tipo alcaloide logrando una inhibición en la línea tumoral H9 de linfoma (Solís *et al.*, 2001), probablemente esto tenga relación con la actividad citotóxica del extracto metanólico y acuoso de *L. schottii* sobre la línea celular HeLa, ya que ambos extractos presentan alcaloides. Franco *et al.*, 2001, utilizaron extractos metanólicos de, *Lophophora williamsii*, (Cactácea) sobre macrófagos murinos y diversas células tumorales teniendo una inhibición significativa del crecimiento tumoral, posiblemente el tipo de extracto por su polaridad extraiga cierto

tipo de metabolito presente en estas especies y con acción citotóxica como la presentada por el extracto metanólico de *L. schottii* (Cactácea) sobre la línea celular HeLa.

Los resultados de *L. schottii* sobre la línea celular HeLa, corroboran los reportes de medicina empírica, citados por Bravo y Sánchez, (1978) y Bravo y Scheinvar, (1995) y los reportados en el Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1994, y los reportes científicos de Wani *et al.*, 1980 sobre sus propiedades anticancerígenas. En el Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, (1994), se reporta que el extracto etanólico de *L. schottii* presenta actividad citotóxica sobre células de carcinoma humano 9KB y antitumoral en ratón con leucemia-P388, lo que se relaciona con lo obtenido para los extractos acuoso y metanólico de esta especie para la línea celular HeLa.

La actividad citotóxica del extracto acuoso de *S. gummosus* no es relevante, sobre la línea celular MCF-7, por otro lado el extracto metanólico de esta misma especie, lejos de perjudicar a la línea celular, la favorece en su crecimiento. Comparados con los extractos acuosos y metanólicos de *L. schottii* que si bien no tienen una actividad citotóxica relevante, tampoco favorecen su crecimiento.

Los resultados de las pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales en ambas especies, nos indican la presencia de alcaloides y triterpenos, esto concuerda con lo citado en Bravo y Sánchez, (1978); Bravo y Scheinvar, (1995), donde además de otros compuestos mencionan los anteriores. Avilés, (2001), reporta la presencia de oxidrilos fenólicos, saponinas, carbohidratos y alcaloides en los frutos de *S. gummosus*, estos compuestos se identificaron en el presente trabajo en tallos y callo "in vitro" de esta especie.

Los resultados del cultivo "in vitro" de *S. gummosus* nos indican que tanto el proceso de escarificación, desinfección y el medio utilizado son adecuados para el desarrollo y crecimiento de las plántulas y el posterior desarrollo de callo, (Avilés, 2001). Las semillas no sufrieron daño alguno al pasar por el proceso de escarificación, ni tampoco hubo contaminación. El medio y la concentración de reguladores fue la idónea para inducir el crecimiento del callo, resultados similares a los que obtuvo Avilés, (2001). En trabajos previos utilizamos medio MS (1962), adicionado con reguladores de crecimiento: K (Cinetina) 1mg/L con BAP 2 mg/L para germinar e inducir brotes de *Hylocereus undatus* (pitahaya orejona). Esta misma proporción se utilizó para hacer germinar las semillas de *S. gummosus* y el resultado fue favorable, por lo que se podría decir, que esta proporción de reguladores tiene un buen efecto sobre la germinación de semillas de ciertas especies de cactáceas, pero origina respuestas morfogenéticas diferentes, ya que en la pitaya agria se desarrollaron callos a partir de los brotes, no así en la orejona. (Morales, 2000).

Los resultados del cultivo "in vitro" para *L. schottii* nos indican que el protocolo de desinfección fue el adecuado, mas no se obtuvo una respuesta morfogenética con el medio y concentración de reguladores probada, como lo recomienda Morales, (2000), al trabajar con otras especies de cactáceas. La oxidación de los tejidos de *L. schottii* al seccionarlos para llevar a cabo la siembra, se trató de corregir en base a lo recomendado por Blanco *et al.*, (2004), sin embargo el problema subsistió. El desarrollo de callo en

uno de los explantes de areóla de *L. schottii*, es probablemente causado por condiciones hormonales endógenas del explante que propiciaron la morfogénesis del callo, como lo mencionan Hurtado y Merino, (1991).

Con respecto a los resultados de las pruebas químicas para identificación de grupos funcionales son muy similares para el extracto acuoso de tallo y metanólico de callo de *S. gummosus*. Es factible como lo recomienda Navia, (1999) el empleo elicitores en el medio de cultivo, para inducir la formación de metabolitos específicos.

Avilés, (2001), reporta la presencia de oxidrilos fenólicos, saponinas, carbohidratos y alcaloides en los frutos de *S. gummosus*, compuestos que están presentes también en los extractos metanólicos de callo, esto corrobora que en el cultivo "in vitro" se mantiene la misma producción de metabolitos secundarios, por lo que se debe de considerar al cultivo de tejidos como una de las alternativas más importantes para obtener metabolitos secundarios de plantas, los cuales son difíciles de sintetizar por la vía química (Topete *et al.*, 1991). Además se destaca la presencia de alcaloides en todos los extractos, inclusive en el de callo, lo que concuerda con lo establecido por Bravo y Sánchez, (1978), quienes mencionan que en la familia de las Cactáceas muchos de sus miembros presentan estos metabolitos.

Los resultados obtenidos en este estudio son muy prometedores por tratarse de extractos crudos y a su vez corroboran los reportes de medicina empírica, citados por Bravo y Scheinvar, 1995 y los de Wani *et al.*, (1980)

154728

10. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *L. schottii* presenta actividad antibacteriana relevante sobre *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes*, y actividad citotóxica *A. salina* con una LD₅₀ 64.57 µg/mL.
- El estudio químico para la identificación de grupos funcionales, determino la presencia de oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas, para los extractos acuosos de tallo de *L. schottii* y *S. gummosus*; mientras que el extracto metanólico de tallo de *L. schottii* solo presentó sesquiterpenlactonas y alcaloides y el de *S. gummosus* determinó la presencia de esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos y alcaloides.
- Algo importante de resaltar, son los resultados del estudio químico para la identificación de grupos funcionales del callo "in vitro" de *S. gummosus*, en el cual se determinó la presencia de oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas, mismo compuesto detectados en los extractos metanólicos de los tejidos "in vivo".
- La citotoxicidad del extracto metanólico y acuoso de *L. schottii* sobre las células MCF-7, presentó una IC₅₀. >100 µg/mL.
- La actividad citotóxica del extracto metanólico *L. schottii* sobre la línea celular HeLa es relevante obteniendo con el extracto metanólico una IC₅₀ de 11.44 µg/mL y con el acuoso la IC₅₀ fue 86.44 µg/mL.
- Los protocolos de desinfección del cultivo "in vitro" para ambas especies fueron eficientes.
- El medio MS (1962) adicionado con BAP 2 mg/L y K 1 mg/L, son una combinación adecuada para inducir morfogénesis de callo en *S. gummosus*.
- Aun cuando se tuvieron resultados positivos para el cultivo "in vitro" de *L. schottii* es muy recomendable ajustar el protocolo y establecer adecuadamente el desarrollo de callo para estudios químicos de identificación de grupos funcionales, en base a los alentadores resultados con la línea celular HeLa.
- Es recomendable caracterizar los compuestos implicados en la inhibición bacteriana y en la actividad citotóxica.
- Se recomienda fraccionar el extracto metanólico de *L. schottii*, para determinar el compuesto activo y establecer la concentración mínima inhibitoria. (CMI), para la línea celular HeLa.
- La actividad citotóxica de estos compuestos permite que el cultivo "in vitro" de estas especies sea una alternativa para la obtención de los mismos.

11. LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A. 2006. Cultivos celulares para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de plantas. Boletín Ciencia y Tecnología. Costa Rica. 48:51
- Abreu PJ, Miranda MM, Toledo CG. 2001. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). Revista Cubana de Farmacia 35(1): 56-60
- Aiyelaagbe O, Adesogan EK, Ekuundayo O, Adeniyi BA. 2000. The antimicrobial activity of roots of *Jatropha podagrica* (Hook) Phytotherapy Research 14(1): 60-2.
- Anderson E, Barthlott W, Brown R. 2001. The cactus family. Editorial Timber Press, New York, pp. 55, 70, 645, 646.
- Angeles JS, Villarreal ML, Quintero R, Pereda MR, Lorence A. 2001. Camptothecin production by *Camptotheca acuminata* cell suspensions. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca México, Julio 14-18.
- Arias CC, Rodríguez MM, Calva CG. 1992. Biotecnología de células y tejidos vegetales: Metabolismo secundario. Avance y Perspectiva 11: 367-374.
- Avilés, AH. 2001. Germinación de la "pitaya agria" *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak, mediante escarificación física y química y análisis fitoquímico del fruto. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bao-Ning Su, Misico M, Jung PE, Santarsiero B, Mesecar A, Fong H, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 2001. New constituents of the leaves and stem of *Physalis philadelphica* (tomatillos) with potencial cancer chemopreventive activity. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca México, Julio 14-18.
- Bianchi E, Cole Jr. 1969. Antitumor agents from *Agave schottii* (Amarillidaceae). Journal of Pharmaceutical Science 58 (5): 589-591.
- Blanco M, Valverde R, Gómez L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis*. Agronomía Costarricense 28(1):07-15
- Boder GB, Ehlhardt WJ, Grindey GB, Houghton PJ. 1992. Discovery of novel antineoplastic sulfonylureas. Drugs of the Future 17:1111-1114.

- Bravo HH, Sánchez MH. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Autónoma de México: México D.F, pp 37, 70, 71, 72, 78 y 81, 105, 107, 108, 109, 138, 139, 140, 611-622.
- Bravo HH, Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica: México D.F, pp 127. 161 y 162.
- Cannell RJP. 1998. Methods in Biotechnology. Vol. 4 Natural Products isolation. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc: Totowa, N.J, pp 1-285.
- Carvajal RI, Cerda GRC, Ramos VA. 2001. Comparative alkaloid production in plants, cells and differentiated organ cultures of *Uncaria tomentosa*. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, Oax. México, Julio 233.
- Cateni F, Zilie J, Falsone G, Siciliano G, Banfi E. 2003. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L: antimicrobial activity evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15, 13(24): 4345-50.
- Chávez D, Baoliang C, Hee-Byung Ch, García R, Mejía M, Farnsworth GA, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn JM. 2001. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca Oax, México, Julio 14-18.
- Cragg GM, Nexman DJ. 1999a. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. Cancer Investigation 17(2):153-63.
- Cragg GM, Nexman DJ. 1999b. Natural product drug discovery and development. In: Phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense. Ed. Romeo. Kluwer Academic: New York, pp. 55-94
- Cruz Vega DE. 2002. Análisis Fitoquímico y caracterización parcial de los compuestos con actividad estimuladora sobre macrófagos y/o actividad antimicrobiana en extractos de raíz, tallo y hoja de *Carlwrightia cordifolia* A. Gray. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Domínguez XA. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México, pp. 39-44, 141-143, 211-228, 246.
- Dowdy SC. 2002. Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer. American Journal of Obstetrics and Gynecology 186(6):1167-73.
- Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of Plants used in Traditional Medicine Drug Discovery. Environmental Health Perspective 109 (1):69.
- Fimbres PY, García R. 1998. Evaluación del efecto fungicida y bactericida de la mezcla de cactáceas *Pachycereus pecten-aboriginum* (cardón) y *Lophocereus schottii* (músaro). XXX Congreso Nacional de Microbiología. México, Abril 2-4.

Franco MM, Támez GR, Rodríguez PC, Támez GP, Mendoza GE, Gómez FR. 2001. VI Simposio de Ciencia y Tecnología. Monterrey N.L. México, Mayo 16-19

Freshney RI. 2000. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique. Ed. Wiley-Liss: Nueva York, pp. 101,182, 309

Fresle DA, Wolfheim C. 1997. Educación al público en uso racional de medicamentos: un estudio internacional. Programa de Acción sobre Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de Salud. Ginebra: OMS.

García MAJ, Morón RF, Alonso CI, López PP, Ruiz SAK. 2005. Estrategia para lograr un uso racional de los medicamentos herbarios. Revista Cubana de Plantas Medicinales 10 (2).

Gil MJ, Manú M, Martínez V, González A, Encío I, Arteaga C, Migliaccio M. 1999. Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 22(3):11-21.

Hartman HT, Kester D, Davies F, Geneve R. 1997. Plant Propagation: principles and practices. Prentice Hall Editions: New Jersey, pp 564-570.

Hee-Juhn P, Jung-Hwan N, Jong-Won C, Jeongkwan P, Kung-Tae L, Won-Tae J. 2001. Structures of codonopside isolated from *Codonopsis lanceolata* roots and the citotoxic activity of prosapogenines. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca Oax, México, Julio 14-18.

Hoffman EJ. 1999. Cancer and the Search for Selective Biochemical inhibitors. CCR Press LLC: New York, pp. 3, 57,61, 88, 96, 97, 147, 187-208, 325-329.

Howert JJ, Grossma NCS. 1990. Novel agents effective against solid tumors: The diarylsulfonylureas. Synthesis, activities, and analysis of quantitative structure-activity relationships. Journal of Medicinal Chemistry 33: 2393-2407.

Howert JJ. 1991. Sulofenur. Drugs of the Future 16: 517-520.

Hurtado MDV, Merino MME. 1991. Cultivo de tejidos Vegetales. Editorial Trillas: México, pp.122-129.

Irobi ON, Moo YM, Anderson WA, Daramola SO. 1994. Antimicrobial activity of bark extracts of *Bridelia ferruginea*. Journal of Ethnopharmacology 43 (3):185-90.

Karkabounas S, Assimakopoulos D, Malamas M, Skaltsounis AL, Leonce S, Zelovitis J, Stefanou D, Evangelou A. 2000. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. Anticancer Research 20(6B):4391-5.

- Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation Methods and applications. T.A. Thorpe, Plant Tissue Culture. Methods and applications in Agriculture. Academic Press: Orlando, Florida, pp. 184-193.
- Kinoshita K, Yang Y, Koyama K, Takahaahi K, Nishino H. 1999. Inhibitory effect of some triterpenes from cacti on ^{32}P -incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Phytomedicine* 6 (2):73-77.
- Koneman W, Allen SD, Dowell VR, Sommers M. Diagnóstico Microbiológico. 1998. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina, pp 380-402.
- Kouznetsov, V.; Palma, A.R. 1997. Química básica de los heterociclos y su importancia práctica. EdicionesUIS. Colombia, pp 196.
- Kumate J. 1993. Información en salud; la salud en cifras. Fondo de Cultura Económica: México, pp 5-45
- Laza LD, Rodríguez LI, Sardina CG. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 8(3): 1
- López P, Ruffa M.J, Martino V, Cavallaro L, Campos R, Ferraro G. 2001. *Lithraea molleoides*: an argentinian Medicinal Plant with cytotoxic activity. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, Oax, México, Julio 14-18.
- Lozoya, X. 1997. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. *Investigación y Ciencia*. 254:4-11.
- Luna PG, Cerda GC, Ramos VA. 2001. Production of indole and oxindole alkaloids in cell culture of *Uncaria tomentosa*. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca Oax, México, Julio 14-18.
- McLaughlin, JL. Chang Ch. And Smith DL. 1988. "Simple bioassays for the detection and isolation of bioactive natural products". Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.
- Manners GD, Hasegawa S, Schoch TK. 2001. Citrus limonoids – Potential cancer chemopreventatives. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, Oax, México, Julio 14-18.
- Mantell S.H, Smith H. 1983. Plant Biotechnology. Cambridge University Press: London, pp. 3-9.
- Marapara, AJL, 2001. Obtención de alcaloides y fenolamidas mediante cultivo in vitro de *Delphinium staphisagria* L. (Ranunculaceae). Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. España.

Martínez M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Editorial Fondo de Cultura Económica: México, pp 754.

Meléndez-Gómez C, Kouznetsov V. 2005. Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. Revista de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana 10(2) 5-18.

Mercado BA, Granados SD. 1999. La pitaya. Biología. Ecología. Fisiología sistemática. Etnobotánica. Universidad Autónoma de Chapingo: México, pp 49.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45:31-34.

Meza ML. 2005. Oligomerización de Fas inducido por camptotecina. Revista Salud Pública y Nutrición 14:24.

Molina FF; Tinoco OC, Niklas KJ. 1998. Stem biomechanics of three columnar cacti from the Sonoran Desert. American Journal of Botany. Structure and Development. 85:1082.

Morales, RME. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo "in vitro" de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Morón RF. 2002. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. Editorial Ciencias Médicas: La Habana, Cuba, pp. 195.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15:473-97.

Muriel C, Qiuwen M, Eun JP, Pezzuto JM. 2001. Anticancer activity mediated by brusatol. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca Oax, México, Julio 14-18

Murillo AJI, Encarnación DR, Franzblau SG. 2001. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Baja California Sur (México) Formerly International Journal of Pharmacognosy 39(6):445-449.

Navia OA, Piñol MT, Joly S, Morales C, Cusidó RM. 1999. Producción de Taxol y baccatina III en cultivo de células en suspensión de *Taxus media* y *T. baccata*, efecto de los elicitores. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología y VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, Sevilla, España, Septiembre 19-22.

Osorio PA, Piñeyro LA, Caballero QA, Waksman TN. 2000. Estudio de la estabilidad acelerada de un potencial fármaco antineoplásico. XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey, México. Octubre 16-35

Osuna L, Pereda MR, Villarreal ML. 2001. "In vitro" production of the sedative Galphimine B by Cell Suspension Culture of *Galphimia glauca*. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca Oax, México, Julio 14-18.

Paladini AC. 1996. Como se descubre o inventa un medicamento. Ciencia Hoy 6(34): 1-11.

Paolini M. 1998. Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies. Toxicology and Applied Pharmacology 152(2):293-4.

Pérez GR, Ávila CA, Edgill RL, Colon YL, Quesada CW, Bello GJL, Panfet C. 2005 Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 10:3-4

Pessoa C, Pajon GR, Vitoriano NH, Leyva A, Lemos T, Odorico MM. 2001. Apoptosis induced "in vitro" by oncocalyxone A, a cytotoxic 1,4-anthracenedione from *Auxemma oncocalix*. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Oaxaca, Oax, México, Julio 14-18.

Pierick R.L.M. 1990. Cultivo "in vitro" de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, pp 292-294.

Pimienta BE. 1999. El pitayo en Jalisco y especies afines en México. Universidad de Guadalajara y Fundación Produce Jalisco, A.C: Jalisco México, pp. 17-115.

Piñol, M.T. 1999. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología y VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, Sevilla, España, Septiembre 22-24

Pires ICF, Figuraueiredo DL, Leitao GG, Leitao SG, Fernades PD. 2001 Cytotoxic effects of fractions obtained from *Rollina sylvatica* dichloromethane extract. 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, Oax. México, Julio 14-18.

Pizzetti M. 1985. Simon and Schuster's guide to cacti and succulents. Editorial Simon and Schuster Inc: New York, pp 157-158.

Popoca SJ, Villarrel OML, Aguilar CA. 1996. Extractos de algunas plantas medicinales como antitumorales. Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax, México, Junio 24-30.

Reinert J, Yeoman M. 1982. Plant Cell and tissue culture, a Laboratory Manual. Springer Verlag: New York, pp 47-55.

- Rico-Bobadilla AC, Gassós OLE, Felix FA. 2001. Efecto antimicrobiano del extracto liofilizado de músaro (*Lophocereus schottii*). XXXII Congreso Nacional de Microbiología, Guanajuato, Gto, México, Abril 3-5.
- Rivas MC. 1998. Diseño de un Medio de Cultivo para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a Escala Piloto para la Obtención de Proteasas Caseínolíticas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rodríguez I, Laza D. 2001. La información científica en homeopatía. Resumed 14(1):5-9.
- Sánchez, GCA. 1995. Efecto de los extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causante de enfermedades gastrointestinales. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Silva Belmares Y. 2005. Identificación de los componentes que presentan actividad antimicrobiana y citotóxica de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta medica* 59:250-252.
- Solís MC, Támez GR, Rodríguez PC, Quintanilla LR, Gómez FR. 2001. VI Simposio de Ciencia y Tecnología, Monterrey, México, Mayo 16-19.
- Topete M, Torres L, Ramírez E, Herrera M y Galindo E. 1991. Avances en los sistemas de Cultivo Masivo de células vegetales. *Ciencia y Desarrollo* 17(99): 73-85.
- Treviño NJF. 2000. Estudio comparativo de los componentes químicos de callo y plántula de *Stenocereus griseus* (Haworth) Buxabaum. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Valencia CO. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Editorial Trillas: México, pp 11-31.
- Valles VSM, Rivas GVM, Waksman TN. 2001. Búsqueda y purificación de una nueva antracenona dimérica. *Revista de la Sociedad Química de México* 45:105.
- Varios Autores. 1994. Atlas de Plantas de la medicina tradicional Mexicana, Tomo II. Instituto Nacional Indigenista: México, pp 1028.
- Vázquez SG, Ochoa OP, Fort MR. 1993. Jardín botánico de la flora sudcaliforniana. UPN. Catalogo No.1 La Paz, B.C.S. pp. 5.
- Wall ME, Wani MC, Taylor H. 1976. Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants. *Cancer Treatment Reports* 60(8):1011-30.

Wall ME, Wani MC, Fullas F, Oswald JB, Brown DM, Santisuk T, Reutrakul V, McPhail AT, Farnsworth NR, Pezzuto JM. 1994. Plant antitumor agents. 31. The calycopterones, a new class of biflavonoids with novel cytotoxicity in a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry* 13;37(10):1465-70.

Wani MC, Thompson JB, Taylor HL, Monroe EW, Miller RW, McPhail AT. 1980. X-Ray crystal and molecular structure of the racemic dimeric tetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artefact from *Lophocereus schottii*. *Journal of Chemical Research* 15

Material electrónico

Edwards N, 1996. Taxol [internet] disponible en el sitio de red <http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol1.htm>

Revisado en la página de Internet el 15 de Octubre del 2006

León L, Pérez-Navarro J. 1997. Advances in the botany of the Gulf of California islands, Baja California, Mexico. [internet] disponible en el sitio de red

<http://www.sdnhm.org/research/symposia/abstg2o.html>

Revisado en la página de Internet el 8 de Noviembre del 2006.

Ramos CF. 2005. Actividad citotóxica de plantas del noreste utilizando el ensayo de letalidad de *Artemia salina* L. [internet] disponible en el sitio de red

<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-08-2005/documentos/02.htm>

Revisado en la página de Internet el 15 de Octubre del 2006

Plantas del desierto. *Lophocereus schottii*. [internet] disponible en el sitio de red

<http://desertplants.clawz.com/index.htm>

Revisado en la página de Internet el 9 de noviembre del 2006

Shiuan Ch, Xiu ZS, Yeh-Chih K, Kwon A, Dujin Z, Eng E. 1998. Suppression of Breast Cancer Cell Growth with Grape Juice. [internet] disponible en el sitio de red

[http://taylorandfrancis.metapress.com/\(1u33fgb3r5zkod455oyy2p45\)/app/home/main.as](http://taylorandfrancis.metapress.com/(1u33fgb3r5zkod455oyy2p45)/app/home/main.as)

Revisado en la página de Internet el 22 de Octubre del 2006

RESUMEN CURRICULAR

María. Eufemia Morales Rubio

Candidato para el grado de

Doctorado en Ciencias con Acentuación en Biotecnología

Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelm) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas.

Campo de estudio: Biotecnología y Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey., N.L., el 12 de agosto de 1954.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, de la Carrera de Biólogo en 1975; Maestría en Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL en el año 2000.

Experiencia Profesional: Instructor de Laboratorio de 1975 a 1977. Maestra por horas de 1975 a 1977. De 1978 a 1980 Maestra de Medio Tiempo y Maestra de Tiempo Completo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL desde Octubre de 1980. a la fecha. Del año 1984 a 1988 Jefe del Área de Biología, de 1990 a 1995 Secretaria Administrativa y Jefe del departamento de Difusión Cultural desde Enero del 2001 a la fecha, a partir del año 2003 Responsable del Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética.



IX Reunión Delegacional de Investigación Médica

Febrero del 2005, Monterrey, N.L. México Edición Especial No. 8-2005

51 Actividad citotóxica de extractos acuosos de *Lophocereus shottii* y *Stenocereus gummosus*
Morales Rubio ME¹, Verde Star MJ¹, Oranday Cárdenas A¹, Rivas Morales C¹, Arévalo Niño K¹, Treviño Neáñez JF¹ y Carranza Rosales P², Cruz Vega DE².

¹Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. ²Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. Monterrey, N.L.

INTRODUCCION: *Lophocereus shotti* y *Stenocereus gummosus* conocidas como músaro y pitaya agria respectivamente, son miembros de la familia cactácea y originarios del noroeste de México. Ambas especies cuentan con antecedentes en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento contra el cáncer.

OBJETIVO: El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad citotóxica de extractos acuosos de ambas especies sobre la línea celular humana de adenocarcinoma mamario MCF-7.

MATERIAL Y METODOS: Los extractos acuosos se obtuvieron de acuerdo al método utilizado en medicina tradicional. La actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7 se realizó en microplaca de 96 pozos, los extractos se adicionaron en un rango de concentración de 10 a 100 µg/mL, utilizando taxol como estándar positivo. La evaluación se efectuó mediante un ensayo colorimétrico, utilizando el reactivo WST-1. Además se determinó la toxicidad por medio del micro-ensayo de letalidad en *Artemia salina*, en este caso, los extractos fueron aplicados en rangos de concentración de 250 a 500 µg/ml.

RESULTADOS: La citotoxicidad se determinó calculando la concentración inhibitoria media sobre la línea celular MCF7, obteniéndose para *L. shotti* una IC₅₀ de 38.9 µg/mL, mientras que para *S. gummosus* una IC₅₀ de 57.54 µg/mL. En el ensayo de letalidad con *A. salina* los extractos de las dos especies presentaron una DL₅₀ mayor a 500 µg/mL.

CONCLUSIONES: Estos resultados indican citotoxicidad selectiva de los extractos debido a que presentan una actividad citotóxica contra la línea celular MCF-7, mientras que son inocuos para *A. salina* a las concentraciones probadas. El presente trabajo es un preámbulo para posteriores investigaciones para identificar los compuestos responsables de la actividad citotóxica sobre la línea celular utilizada.

PALABRAS CLAVE: *Lophocereus shotti*, *Stenocereus gummosus*, citotoxicidad, células MCF-7, *Artemia salina*.

BIBLIOGRAFIA:

Bravo-Hollis H. y Sánchez Mejorada H. 1991. Las cactáceas de México, Vol. III. Primera edición. México, D.F. U.N.A.M. pp 511

Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta med* 59:250-252.

Ayoyo PAICYT: SA-999-04



Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición
Ave. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuriria,
Col Mitras Centro, Monterrey, N.L. México 64460
Tels. (8)348-4354, 348-6080, 348-6447
respyn@faspyn.uanl.mx



Universidad Autónoma de Nuevo León
webmaster@uanl.mx



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



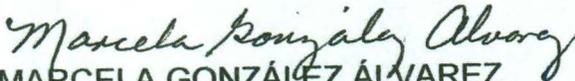
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

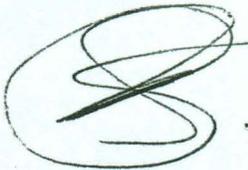
M. C. MA. EUFEMIA MORALES RUBIO
Presente.

Estimada M. C. Morales Rubio:

Por medio de la presente informamos a Usted que el artículo: CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS METANÓLICOS Y ACUOSOS DE MÚSARO (*Lophocereus shottii* (Engelm) Britton and Rose Y PITAYA AGRIA (*Stenocereus gummosus* (Engelm) Gibson y Horak) SOBRE CÉLULAS HeLa, bajo la autoría de: M. E. Morales Rubio¹, J. Verde Star¹, A. Oranday Cárdenas¹, C. Rivas Morales¹ J. Treviño Neávez¹, P. Carranza Rosales² y D. E. Cruz-Vega² ha sido ACEPTADO para publicarse en el libro: TEMAS SELECTOS DE BOTÁNICA 3, editado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ATENTAMENTE
ALERE FLAMMAM VERITATIS
Cd. Universitaria, 30 de Agosto de 2006.


DRA. MARCELA GONZÁLEZ ÁLVAREZ
EDITOR


M. C. SERGIO SALCEDO MARTÍNEZ
EDITOR



MEMORIAS

VII SIMPOSIO DE BOTANICA



Instituto de Ecología y Evolución



MEMORIAS VII SIMPOSIO DE BOTANICA



CREDITOS

PROGRAMACIÓN Y DISEÑO
Lic. Damián Pérez Rodríguez

COORDINACIÓN
Tec. Blanca Luisa Guerra

BASE DE DATOS
MSc. Reina Echevarría Cruz

EDICIÓN DE TEXTOS
Tec. Teresa Regalado

MEMORIAS
Copyright(C) 2003 Instituto de Ecología y
Carretera de Varona km 3.5, Capdevila.
Ciudad de la Habana, Cuba.
E-Mail: direccion.ies@ama.cu
ISBN: 959-270-029-X



Instituto de Ecología y Sistemática

RESUMEN

El presente libro es el resultado de los trabajos realizados durante el VII Simposio de Botánica, que se celebró en el Instituto de Ecología y Sistemática, en la ciudad de Varona, provincia de Matanzas, del 2 al 6 de octubre de 2002. El simposio tuvo como tema central el estudio de la diversidad biológica y el uso sostenible de los recursos biológicos. Durante el simposio se presentaron trabajos científicos y comunicaciones que abarcan una amplia gama de temas relacionados con la botánica, desde la taxonomía y la sistemática hasta la ecología y la conservación de la biodiversidad. El libro recoge los resultados de estos trabajos, que constituyen un valioso aporte al conocimiento de la flora cubana y de la biodiversidad en general. El libro está dirigido a los botánicos, ecólogos y conservacionistas interesados en el estudio de la diversidad biológica y el uso sostenible de los recursos biológicos.

VII SIMPOSIO DE BOTANICA, EL ANILLO, CIUDAD DE VARONA, MATANZAS, CUBA, 2002

CULTIVO DE (*Stenocereus gummosus*) (Engelm) Gibson y Horak, *IN VITRO* , ESTUDIO FITOQUÍMICO DE TALLOS Y FRUTOS

M.E. MORALES RUBIO, J. VERDE STAR, CRUZ VEGA D.E A ORANDAY CÁRDENAS, RIVAS MORALES C., AREVALO NIÑO K y J.F. TREVIÑO NEÁVEZ. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. e-mail: mmorales113@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

Stenocereus gummosus (Engelm) Gibson y Horak llamada en la zona Norte de México "pitaya agria" es una cactácea (Fig. 1) que se distribuye en Baja California y Sonora. Su fruto, de color rojo es apreciado por su sabor agridulce Anderson (2001). Esta especie por los metabolitos que presenta tiene diversos usos en la medicina tradicional para combatir algunas enfermedades como úlceras y diversos tipos de cáncer, Bravo Hollis H y Sánchez-Mejorada H. (1978) y Bravo Hollis H. y L. Scheinvar. (1995). En la actualidad, las técnicas de cultivo de vegetales tienen grandes aplicaciones en la agricultura, industria farmacéutica, alimentaria, etc. Mediante estas técnicas es posible realizar una propagación clonal de especies vegetales de importancia Morales Rubio (2000). El objetivo del presente trabajo fué determinar los metabolitos presentes en tallos y frutos de *S. gummosus* y establecer su cultivo *in vitro* a partir de semillas.



Fig. 1. Plantas de *S. gummosus*, donde se aprecian tallos, flores y frutos

METODOLOGÍA

Las semillas se extrajeron de frutos frescos, siendo sometidas a escarificación con ácido clorhídrico concentrado por 30 segundos, en base a lo establecido por Avilés Arnaut H (2001), posteriormente se procedió a su desinfección con cloro al 10% por 15 minutos, seguido de un lavado en agua estéril y fueron sembradas en medio MS según Murashige T. and F. Skoog. (1962), adicionado con BAP (Bencilaminopurina) 2 mg/l y K (Cinetina) 1 mg/l, y colocadas bajo condiciones de luz y temperatura controlada. Para el estudio fitoquímico se realizó siguiendo lo recomendado por Domínguez X A. (1973), se utilizaron tallos y frutos frescos, se molieron y se colocaron en diferentes solventes de polaridad creciente, para obtener los extractos. Posteriormente se realizaron las pruebas coloridas y cromatográficas, para determinar los posibles metabolitos presentes en la planta.

RESULTADOS

Los resultados del cultivo *in vitro* nos indican que tanto el proceso de escarificación, desinfección y el medio utilizado son adecuados para el desarrollo y crecimiento de las plántulas. Se observó una germinación del 70 % de las semillas colocadas iniciando esta al séptimo día y concluyendo el día 12, indicando estos resultados que el proceso de escarificación empleado elimina la dormancia de las semillas sin dañarlas, también se constató un porcentaje de 0 contaminación, en cuanto a la formación de callo a partir de las plántulas germinadas *in vitro* se obtuvo abundante material (Fig. 2). El estudio fitoquímico de los tallos, nos revela la presencia de diversos compuestos como: esteroides, flavonoides, alcaloides, carbohidratos, y sesquiterpenoides; mientras que en los frutos fueron detectados saponinas, alcaloides, flavonoides y leucoantocianinas (considerados como antioxidantes naturales).

MEMORIAS

VII SIMPOSIO DE BOTÁNICA, La Habana Cuba Junio, 2003

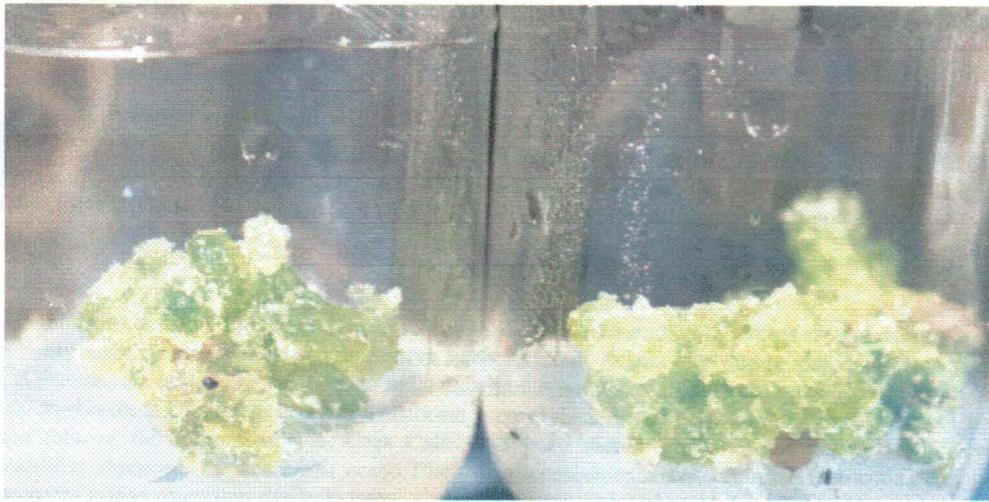


Fig. 2. Desarrollo de callo a partir de plántulas germinadas *in vitro*

CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

(Morales-Rubio 2000), utilizó medio MS 1962, adicionado con reguladores de crecimiento: K (Cinetina) 1mg/l con BAP 2 mg/l para germinar e inducir brotes de *Hylocereus undatus* (pitahaya orejona). Esta misma proporción se utilizó para hacer germinar las semillas de *S. gummosus* y el resultado es favorable, por lo que se podría decir, que esta proporción de reguladores tiene un buen efecto sobre la germinación de semillas de ciertas especies de cactáceas, pero origina respuestas morfogenéticas diferentes, ya que en la pitahaya agria se desarrollaron callos a partir de los brotes, no así en la orejona. Podemos concluir que estos compuestos pueden ser una alternativa para ser utilizados en las industrias antes mencionadas, siendo el cultivo *in vitro* una opción para su obtención. Siendo muy recomendable probar los extractos para ver su posible efecto como biocidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson E.F. 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland Oregon. Págs: 55, 645 y 646.
- Avilés arnaut H. (2001). Tesis de Licenciatura, para Obtener el Título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL Págs: 30,31.
- Bravo Hollis H, Sánchez-Mejorada H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. Págs. 446-453.
- Bravo Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. México D.F. Págs. 127.
- Domínguez X A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México D.F. p.p. 39-44, 211-228.
- Morales Rubio M.E. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo "*in vitro*" de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. Tesis de Maestría, Especialidad en Botánica. Fac. de C. Biológicas. UANL. Pág. 25.
- Murashige T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.

MEMORIAS

VII SIMPOSIO DE BOTÁNICA, La Habana Cuba Junio, 2003

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE *Lophocereus schottii* (ENGELM) BRITTON AND ROSE

M.E. MORALES RUBIO, J. VERDE STAR, A. ORANDAY CÁRDENAS, C. RIVAS MORALES, K. ARÉVALO NIÑO, D.E. CRUZ VEGA⁽¹⁾ Y J.F. TREVIÑO NEÁVEZ. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DEL NORESTE IMSS⁽¹⁾. e-mail: mmorales113@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

En cuanto a su distribución según Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada (1978), es en el desierto Crasicaule que comprende el norte del estado de Sonora hasta Arizona, es una área donde abundan las cactáceas, de ahí el nombre de crasicaule, también se halla distribuida en el sur del desierto sarcófilo que comprende el tercio medio de la Península de Baja California y en el desierto arbocrasicaulescente que comprende el tercio inferior de la Península de Baja California y en menor grado en los valles de la selva baja caducifolia espinosa. La describen como Plantas arborescentes o en forma de matorrales con pocas o numerosas ramas que salen desde la base. Costillas en ramas jóvenes de 4 a 10, en las ramas maduras de 5 a 13. Aréolas inferiores pequeñas, ovales, ligeramente lanosas, de 3 a 5 mm de ancho; espinas 1 a 15, de 2 a 10 mm de largo, grises o morenas. Aréolas superiores circulares o elípticas, más anchas que largas, de 7 a 15 mm de ancho, densamente lanosas; espinas 20 a 75, de 3 a 7 y hasta 11 cm de largo, ligeramente aplanadas, torcidas, setosas, en fascículos compactos. Flores infundibuliformes, hasta como de 4 cm de largo y 3 cm de ancho, blanquecinas o con tinte rosa. Fruto rojo, carnoso, globos hasta ovalado u oblongo, de 1 a 3 cm de ancho, con pulpa roja. Semillas pardas, casi negras, brillantes, ovaladas, de 2 a 3 mm de largo. Anderson *et al* (2001); Bravo Hollis y Sánchez Mejorada (1978) reportan los siguientes compuestos químicos para *L. schottii*, triterpenos: lupeol. y lofenol. Bravo Hollis H. y L. Scheinvar (1995) reportan que el cocimiento del tallo es utilizado con mucha frecuencia en medicina popular para curar diabetes y cáncer, siempre prefiriendo los tallos de cinco costillas. El Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (1994), reporta que *L. schottii* produce los alcaloides: isoquinolina, lofocerina (en toda la planta) y pilocereína (solo en tallos); los triterpenos lofenol y lupeol en tallos y el esterolescotenol. En Sonora usan los tallos de esta planta para curar heridas, úlceras, cáncer estomacal y diabetes. En base a estos conocimientos empíricos nos propusimos demostrar la actividad biológica de los extractos de esta especie, primeramente en bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Se utilizaron los tallos de *L. schottii*.

Microorganismos usados: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocitogenes*.

Se obtuvieron 250 gr. del tallo de *L. schottii*. el cual se molió en un molino tipo "Willey" este macerado se agregó a 300 ml. de acetona (menor polaridad) en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml y se colocó en un agitador Dual Action Shaker Lab Line, por un periodo de 7 días, se separó el solvente del extracto por filtración con en papel Whatman No.1 y después se utilizó un Rotavapor Büchi 461 para concentrar la muestra y luego por medio de evaporación en la campana de extracción terminar de obtener el extracto, el macerado se colocó en un solvente de alta polaridad, el metanol, utilizando el mismo procedimiento que con el primer solvente. El extracto etanólico se elaboró a manera de tintura el macerado de la planta se colocó en alcohol etílico absoluto por 30 días, sometiéndose al mismo método de separación del solvente. Para las pruebas con bacterias, se utilizó el medio líquido C. Rivas (glucosa, peptona de colágena y extracto de levadura) para la activación de las cepas bacterianas, incubándolas por 18 - 24 h a 37°C. Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se utilizó el método de difusión en placa por triplicado, colocando 100 µL del inóculo con una micropipeta Eppendorf difundiéndolo homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 µL del extracto y un control negativo con etanol, y un control positivo con cloranfénicol, se incubaron durante 18-24 h a 37°C, después de este período se midió el halo de inhibición formado Sánchez G, (1995).

MEMORIAS

VII SIMPOSIO DE BOTÁNICA, La Habana Cuba Junio, 2003

RESULTADOS

El extracto metanólico de *L. schottii* resulto positivo para todas las cepas bacterianas excepto para *Pseudomonas aeruginosa*, el extracto acetónico fue positivo para *Salmonella typhi*, y *Enterobacter aerogenes*, no así para *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocitogenes*, mientras que el extracto etanólico fue negativo para todas las cepas probadas inicialmente. En pruebas posteriores el extracto etanólico resulto positivo para el control de *Streptococcus faecalis*.

Extracto/controles*	P.a.	S.t.	E.a.	L.m.
Metanólico	-	+	++	+
Acetona	-	+	+	-
Etanol	-	-	-	-
Cloranfenicol*	+++	+++	+++	+++
Etanol*	-	-	-	-

Tabla No 1.- Actividad biológica de los extractos de *L. schottii* sobre cuatro cepas bacterianas P.a. = *Pseudomonas aeruginosa*, S.t.= *Salmonella Typhi*, E.a.= *Enterobacter aerogenes*, L.m.= *Listeria monocitogenes*.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Los extractos de *L. schottii* poseen una actividad antimicrobiana, la cual es manifiesta al presentar los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (Sánchez G, 1995), en ningún momento igualan al control positivo utilizado (cloranfenicol), pero se tiene que tener en cuenta que los extractos son combinaciones de compuestos, no el componente puro como lo es el cloranfenicol. Por lo que es recomendable caracterizar los compuestos implicados en la inhibición y hacer la comparación correspondiente con el control positivo para así observar la verdadera actividad bactericida.

REFERENCIAS

- Anderson, E.; Barthlott, W.; Brown, R. (2001). The cactus family. Editorial Timber Press. pp. 55, 70, 645, 646.
- Bravo Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. México D.F. Págs. 127. 161 y 162.
- Bravo Hollis H. y M.H. Sánchez . 1978 . Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. Págs. 37,70,71,72.78 y 81, 105,107,108 , 109, 138,139,140, 611-622.
- Rivas-Morales, C. (1998). Diseño de un Medio de Cultivo para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a Escala Piloto para la Obtención de Proteasas Caseínicas. Tesis Doctorado Especialidad Microbiología Médica, Facultad de Medicina UANL. Monterrey, Nuevo León, México
- Sánchez , G.,C.A.(1995). Efecto de los extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causante de enfermedades gastrointestinales. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L. Monterrey N.L.
- Varios Autores. 1994. Atlas de Plantas de la medicina tradicional Mexicana, Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. Pág. 1028.

MEMORIAS

VII SIMPOSIO DE BOTÁNICA, La Habana Cuba Junio, 2003



Memoria
IX Congreso Nacional
VII Congreso Internacional
Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal



Zacatecas, México / 2003

EDITORES

Gastón Esparza Frausto
Miguel Angel Salas Luévano
Jaime Mena Covarrubias
Ricardo David Valdez Zepeda



Elemento iconográfico que representa la señal que buscaban los aztecas en su peregrinación hacia el Valle de México, y es la representación mas antigua de nuestro escudo nacional con el águila devorando a la serpiente. Este elemento fue parte de la cultura Chalchihuites (Zacatecas).

Coedición:
Universidad Autónoma Chapingo
Universidad Autónoma de Zacatecas
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y
Agropecuarias

Primera edición en español, 2003

ISBN 968-884-955-3

L.R © Universidad Autónoma Chapingo
Carretera México-Texcoco km. 38.5
Estado de México.

Impreso en México

Zacatecas, Zac., 2 al 6 de Septiembre, 2003

ESTUDIOS GERMINATIVOS DE *Stenocereus gummosus* MEDIANTE ESCARIFICACIÓN Y ESTUDIO FITOQUÍMICA DEL FRUTO

HAMLET AVILES ARNAUT,¹ MA. EUFEMIA MORALES RUBIO,¹ JAIME FCO. TREVIÑO NEÁVEZ,¹ AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS,² MA. LUISA CÁRDENAS ÁVILA¹

¹Laboratorio de Micropropagación Vegetal. ²Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ap. Postal # 67 F. San Nicolás de los Garza N.L., México

E-mails: mmorales113@hotmail.com, jneavez@hotmail.com, azucenaoranday@hotmail.com, cardenasavila@yahoo.com

ABSTRACT

Stenocereus gummosus fruits are appreciated for its sweet and sour flavor. Dormancy avoids seed germination until optimum environmental conditions make sure seedling growth and survival in the desert. Some germination treatments were tested. Scarification with sulphuric acid during 30 seconds resulted in 45% of germination with a high survival rate (95.23%) and low mortality (4.76%). Also sour pitaya extracts were analyzed. Findings showed the follow secondary metabolites: sterols and triterpenes, carbohydrates, flavonoids, leucoanthocyanins, alkaloids, saponins and anti-oxidants, all of them with potential industry applications.

KEY WORDS: Dormancy, germination, cacti, phytochemistry.

INTRODUCCIÓN

La "pitaya agria", *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson y Horak, se distribuye en casi toda la Península de Baja California y en la costa de Sonora. Su fruto, de color rojo, es apreciado por su sabor agridulce, del tamaño de una naranja y está cubierto de espinas. Tiene características valiosas, las cuales se han empezado a valorar en el mercado nacional y sobre todo en el internacional, donde se le conoce como fruta exótica. La fruta se consume fresca ó seca y es usada para hacer dulces, jugos, nieve, jaleas, mermeladas y bebidas alcohólicas. El pitayo agrio presenta triterpenos y saponinas venenosos, por lo que pedazos del tallo son tirados al agua para envenenar peces y posteriormente consumirlos. Los triterpenos encontrados en *Stenocereus gummosus* son: ácido machaérico, ácido machaerínico (isómero del ácido queretaroico de *Stenocereus queretaroensis* y del ácido cochalico de *Myrtillocactus cochal*) y gummosogenina.¹ La inhibición de la germinación ó dormancia innata de las semillas de *S. gummosus*, es producida por la presencia inhibitoria de compuestos endógenos en la testa. Una forma de eliminación de la dormancia es por la pérdida de las cubiertas que los contienen (pericarpio, testa ó partes florales adheridas a la semilla) y la otra es la lixiviación por el agua. Es probable que el calentamiento y determinadas sustancias eliminen la dormición química al inactivar a los inhibidores². Se ha evaluado el efecto promotor de la hidratación discontinua sobre la germinación de *S. gummosus* y menciona que estas semillas tienen una memoria de los cambios internos inducidos por un tratamiento de hidratación, la cual puede permitirles resistir períodos de desecación y germinar rápidamente después de una

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos se colectaron en "El Ancón" y "El Triunfo", ambos ejidos ubicados en B.C.S. Para la germinación de las semillas, se separaron las semillas del fruto y éstas se lavaron con detergente líquido, para luego desinfestarse con solución de cloro al 10%. Se dejaron secar por 24 horas (hrs) para ser tratadas con 13 métodos de escarificación y un testigo

Tratamientos de escarificación

Cada tratamiento fue aplicado a un lote de 20 semillas:

- Baño María a 50 grados C. por 24 hrs. y oscuridad.
- Baño María a 50 grados C. por 48 hrs. con luz.
- Inmersión en solución de hidróxido de sodio al 0.5% por 3 hrs.
- Inmersión en ácido clorhídrico concentrado por 30 min.45%.
- Inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 30 segundos.
- Inmersión en peróxido de hidrógeno por 24 hrs.
- Solución de giberelinas a 1000, 500 y 200 ppm.
- Congelamiento a -8 grados °C. por 15 días y oscuridad.
- Hidratación en agua corriente por 24 hrs.
- Lijado en seco por 10, 20 y 30 minutos.
- Lijado húmedo por 30 minutos.
- Ciclos de hidratación-sequía (48 horas cada uno) en oscuridad.
- Ciclos de hidratación-sequía (48 horas cada uno) con luz.
- Hidratación constante en agua. (testigo).

Siembra

Cada lote de 20 semillas se colocó en pequeñas cajas de plástico con tapa, que poseen un disco de papel filtro en el fondo y se agregó 0.5ml de solución de fungicida (captán al 1%) hasta cubrir las semillas. Las semillas se dejaron germinar durante 30 días a temperatura ambiente, con un fotoperíodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. La germinación de la semilla se determinó con la observación de la radícula.

Fitoquímica

Se realizaron extracciones en frío (Shaker) durante siete días, tanto de la pulpa como de la cáscara del fruto, utilizando solventes en orden de polaridad creciente: hexano, cloroformo y metanol. Los seis extractos obtenidos se analizaron químicamente mediante pruebas coloridas para determinar la presencia de materia orgánica e inorgánica, insaturaciones, fenoles, esteroides, carbohidratos, coumarinas, lactonas y sesquiterpenlactonas, flavonoides, alcaloides y saponinas que pudieran representar una utilidad práctica del fruto de la pitaya agria.

RESULTADOS

Escarificación

De los trece métodos de escarificación aplicados a las semillas de *S. gummosus*, se logró un mayor porcentaje de germinación (45%) al utilizar la inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 30 segundos, le siguió giberelinas a 200 ppm y 1000 ppm con 30% y 25% respectivamente. El resto de los métodos de escarificación lograron porcentajes de germinación menores al 25% o nulos. Los resultados se aprecian en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos y porcentaje de germinación

Tratamiento	Germinación
1. Baño María a 50°C por 24 hr y oscuridad.	0%
2. Baño María a 50°C por 48 hr con luz.	0%
3. Inmersión en solución de NaOH al 0.5% por 3 hrs.	10%
4. Inmersión en HCl concentrado por 30 min.	0%
5. Inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 30 seg.	45%
6. Inmersión en peróxido de hidrógeno por 24 hrs.	10%
7. Solución de giberelinas a 200 ppm.	30%
b) Solución de giberelinas a 500 ppm.	15%
c) Solución de giberelinas a 1000 ppm.	25%
8. Congelamiento a -8°C por 15 días y oscuridad.	0%
9. Remojo en agua corriente por 24 hrs.	0%
10. Lijado seco por 10 min.	5%
b) Lijado seco por 20 min.	0%
c) Lijado seco por 30 min.	20%
11. Lijado húmedo por 30 min.	5%
12. Ciclos de remojo-sequía (48 horas cada uno) en oscuridad.	0%
13. Ciclos de remojo-sequía (48 horas cada uno) con luz.	0%
14. Remojo constante (Testigo).	0%

Fitoquímica

El extracto metanólico de la cáscara fue el único en presentar oxhidrilos fenólicos y saponinas. Los extractos metanólicos de la cáscara y la pulpa no presentaron esteroides ni triterpenos, mas sin embargo fueron los únicos que poseen carbohidratos (azúcares). El extracto clorofórmico de la cáscara dio reacción negativa a los flavonoides, pero positiva a los alcaloides.

DISCUSIÓN

Es probable que el ácido sulfúrico concentrado esté llevando a cabo una doble acción sobre la

inhibidor endógeno ó como agente eliminador de la testa. La eficiencia del ácido sulfúrico conlleva al mismo tiempo la hidrólisis del inhibidor y la degradación homogénea de la testa debido a una mayor área superficial de exposición y contacto de la semilla con el agente escarificante, lo cual puede ser un factor importante que determina la diferencia entre los porcentajes de germinación de éste método con el resto de los bioensayos realizados. Por otra parte, es posible que las saponinas y los triterpenos encontrados en los extractos de la cáscara sean aquellos que menciona Bravo-Hollis (1978) como venenosos y útiles en la pesca.

CONCLUSIONES

La inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 30 segundos es el mejor método de escarificación que elimina la dormancia en semillas de *Stenocereus gummosus*, reflejándose como el aumento en el porcentaje de germinación hasta en un 45%. El análisis fitoquímico del fruto revela que los grupos de compuestos más importantes presentes en la pitaya agria son: los alcaloides, saponinas, flavonoides y triterpenos, los que pudieran tener aplicación en las Industrias Farmacéutica y Alimenticia.

LITERATURA CITADA

- Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. (1978). Las cactáceas de México, Vol. I y III. Primera edición. México, D.F. U.N.A.M. 65, 511 pp.
- Camacho-Morfin, F. (1994). Dormición de semillas. Causas y tratamientos. Editorial Trillas. Primera edición. México, D.F. 9 pp.
- Dubrovsky, J. G. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. Abstract Volume 203, Issue 1. pp. 85-92.